



Ana Isabel Braz Opinião

Licenciada em Biologia Celular e Molecular

**Caracterização cariológica do fungo
Hemileia vastatrix responsável pela
ferrugem alaranjada do cafeeiro**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia

Orientador: Sílvia Tavares, Ph.D, CIFIC/ IICT - ITQB-UNL
Co-orientador: Rita Abranches, Ph.D, ITQB-UNL
Pedro Talhinhos, Ph.D, CIFIC/IICT

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Rui Manuel Freitas Oliveira
Arguente: Prof. Doutora Maria Helena Mendes da Costa Ferreira Correia de Oliveira
Vogal: Prof. Doutora Sílvia Andreia Godinho Barquinha Tavares



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março de 2012



Caracterização cariológica do fungo *Hemileia vastatrix* responsável pela ferrugem alaranjada do cafeeiro
Ana Opinião



Ana Isabel Braz Opinião

Licenciada em Biologia Celular e Molecular

Caracterização cariológica do fungo *Hemileia vastatrix* responsável pela ferrugem alaranjada do cafeeiro

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia

Orientador: Sílvia Tavares, Ph.D, CIFIC/ITQB-UNL
Co-orientador: Rita Abranches, Ph.D, ITQB-UNL
Pedro Talhinhos, Ph.D, CIFIC/IICT

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Rui Manuel Freitas Oliveira
Arguente: Prof. Doutora Maria Helena Mendes da Costa Ferreira Correia de Oliveira
Vogal: Prof. Doutora Sílvia Andreia Godinho Barquinha Tavares



Março de 2012

Caracterização cariológica do fungo *Hemileia vastatrix* responsável pela ferrugem alaranjada do cafeeiro

Copyright Ana Isabel Opinião, FCT/UNL, UNL

“A faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de adquirir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado critério ao autor e editor”

Agradecimentos

No final desta importante etapa, queria agradecer em especial a algumas pessoas que ajudaram na elaboração da tese, pelo esforço e empenho demonstrados e pelo apoio que me deram em todos os momentos.

Agradeço em primeiro lugar à minha orientadora, Doutora Sílvia Tavares pela paciência, transmissão de conhecimentos, disponibilidade em várias ocasiões, incentivo, ajuda, empenho e amizade criada durante todo o estágio. Um obrigado muito especial!

Agradeço à Doutora Rita Abranches, pela ajuda e disponibilidade sempre demonstrados ao longo do estágio.

Agradeço à Doutora Ana Sofia Pires pela ajuda em várias ocasiões e pela disponibilidade sempre demonstrada ao longo do estágio e pela agradável companhia no congresso.

Agradeço ao Doutor Pedro Talhinhos e Doutora Helena Azinheira pela forma bem-disposta como me receberam no CIFIC no início do meu estágio e pela ajuda disponibilizada desde sempre.

A todo o pessoal do CIFIC que me recebeu de braços abertos, em especial à Doutora Andreia Loureiro e à Doutora Maria do Céu Silva.

Agradeço a duas amigas muito especiais: a Joana e a Carla pelo apoio, pelas inúmeras vezes que partilharam bons e maus momentos e pela paciência em me ouvirem tantas vezes. Obrigado pelo apoio incondicional!

Agradeço ao Hélio e à Cláudia pelas conversas nas horas de almoço e pelo interesse que demonstraram sempre nas minhas actividades.

Agradeço à Helena pela amizade criada e pelo companheirismo durante os breves meses que passou pelo laboratório.

Agradeço aos meus pais, pela paciência e pela compreensão em algumas ausências e pelo interesse no meu trabalho.

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia, projecto PTDC/AGR-GPL/114949/2009 “A perspectiva do patogénio das interacções moleculares planta - microrganismo: genes expressos durante o processo de infecção da ferrugem alaranjada do cafeeiro - *Hemileia vastatrix*”.

A todos um grande OBRIGADO! =)

Resumo

A ferrugem alaranjada é a doença mais importante do cafeeiro Arábica (*Coffea arabica*), provocada pelo fungo *Hemileia vastatrix*. As quebras na produção de café e os prejuízos económicos tornam essencial o conhecimento da biologia deste fungo, para posterior compreensão das interações estabelecidas entre este e o cafeeiro.

Este trabalho teve como principal objectivo o estabelecimento do cariótipo de *H. vastatrix*. Foram utilizados dois isolados pertencentes a raças distintas 1065 (raça II) e 71 (raça VI) e duas técnicas complementares: uma citológica e outra electroforética. A primeira baseou-se no método do rebentamento dos tubos germinativos, de forma a libertar os núcleos do interior dos tubos e, após optimização, permitiu estimar um número de cromossomas entre sete e 14 para o isolado 71. A segunda utilizou a electroforese em gel de campo pulsado, sendo que a principal limitação à aplicação desta técnica passou pela produção de protoplastos em número suficiente, essencial na obtenção de cromossomas intactos. Para ultrapassar esta restrição foi testado um protocolo alternativo que conduziu a um resultado positivo, tendo sido possível observar um padrão electroforético para os dois isolados, mas que ainda assim necessita de optimização. Por último foi implementada a técnica de hibridação *in situ* por fluorescência para núcleos de *H. vastatrix* que permitiu a identificação de rDNA em núcleos interfásicos dos dois isolados.

As técnicas executadas neste trabalho foram aplicadas pela primeira vez a *H. vastatrix* e contribuirão para uma futura determinação do número de cromossomas de diferentes isolados de raças distintas, com o objectivo de ligar a patogenicidade de cada raça a polimorfismos ao nível do genoma.

Palavras-chave: cariótipo, electroforese em gel de campo pulsado, hibridação *in situ* por fluorescência, *Hemileia vastatrix*, método do rebentamento dos tubos germinativos.

Abstract

Leaf rust is the most important disease of Arabica coffee (*Coffea arabica*), caused by the fungus *Hemileia vastatrix*. The breaks in the coffee production and the economic losses caused by this disease makes essential the knowledge of the biology of this fungus, in order to understand the interactions established between it and the coffee plant.

This work main goal was the establishment of *H. vastatrix* karyotype, using two isolates from different races 1065 (race II) and 71 (race VI) and two distinct techniques: cytologic and electrophoretic one. The first was based on the germ tube burst method (GTBM) and after optimization, it allowed the release of nuclei from the germ tubes of *H. vastatrix* and estimation a chromosome number between seven and 14 to the isolate 71. The second comprised the pulsed field gel electrophoresis (PFGE): the main difficulty was on the isolation of intact chromosomes for which two protocols were tested. Although a electrophoretic pattern was obtained for both isolates, the result was unclear and needs further optimization. Finally the technique of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was implemented for *H. vastatrix*, which allowed the identification of rDNA in interphasic nuclei of both isolates.

The techniques implemented in this work were applied for the first time to *H. vastatrix*, and will contribute for further characterization of the karyotype of isolates from distinct races which presents different levels of virulence spectra, in order to reveal polymorphism in the genome of *H. vastatrix* races.

Key words: fluorescence *in situ* hibridization, germ tube burst method, *Hemileia vastatrix*, karyotype, pulsed field gel electrophoresis.

Índice

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Lista de abreviaturas	xix
Capítulo I: Introdução	1
Introdução	3
Objectivos	4
1. Ferrugem alaranjada do cafeeiro	4
1.1 Hospedeiro: cafeeiro	4
1.1.1 Origem	4
1.1.2 Classificação taxonómica e características gerais do cafeeiro	5
1.2 Agente patogénico: <i>Hemileia vastatrix</i> Berk. & Br.	5
1.2.1 Origem e distribuição geográfica	5
1.2.2 Taxonomia	6
1.2.3 Sintomatologia	7
1.2.4 Ciclo de vida	8
1.3 Processo de infecção	10
1.4 Disseminação dos esporos de <i>H. vastatrix</i>	12
1.5 Luta genética	12
2. Cariotipagem	13
2.1 Caracterização citológica: Método do rebentamento dos tubos germinativos (GTBM - Germ Tube Burst method)	14
2.2 Caracterização electroforética: Electroforese em gel de campo pulsado (PFGE - Pulsed Field Gel Electrophoresis)	14
2.3 Fluorescence <i>In situ</i> Hybridization (FISH)	17
Capítulo II: Material e métodos	21
2.1 Material Biológico	23
2.1.1 Raças fisiológicas utilizadas	23
2.2 Germinação dos esporos de <i>H. vastatrix</i>	24
2.2.1 Obtenção de tubos germinativos	24
2.2.2 Obtenção de apressórios	25
	xi

2.3 Cariotipagem citológica	25
2.3.1 Tratamento das lâminas com poli-L-lisina	25
2.3.2 Amostragem	26
2.3.3 Agentes bloqueadores (tiabendazol)	26
2.3.4 Método do rebentamento dos tubos germinativos	26
2.3.5 Coloração do DNA	27
2.4 Cariotipagem electroforética – Electroforese em gel de campo pulsado	27
2.4.1 Preparação dos protoplastos	27
2.4.2 Imobilização do material biológico	28
2.4.3 Pulsed Field Gel Electrophoresis	28
2.5 Fluorescence <i>in situ</i> hybridization	30
2.5.1 Plasmídeos pABM1 e pABM2	30
2.5.2 Purificação do plasmídeo	31
2.5.3 Marcação das sondas	31
2.5.4 Determinação do tamanho da sonda	32
2.5.5 Confirmação da marcação da sonda por Dot-Blot	33
2.5.6 Purificação da sonda	33
2.5.7 Protocolo FISH	33
Capítulo III: Resultados e discussão	37
3.1 Cariótipo citológico de <i>H. vastatrix</i>	39
3.1.1 Optimização do GTBM	44
3.1.2 Identificação das fases do ciclo mitótico	45
3.1.3 Análise das figuras metafásicas	47
3.2 Caracterização electroforética	48
3.2.1 Obtenção de protoplastos	48
3.2.2 Electroforese em gel de campo pulsado	50
3.3 Fluorescence <i>in situ</i> Hybridization	53
3.3.1 Confirmação da marcação da sonda por Dot-Blot	53
3.3.2 Determinação do tamanho molecular da sonda	53
3.3.3 Identificação de DNA ribossomal	54
Capítulo IV: Conclusões finais e perspectivas	57

Capítulo V: Bibliografía	61
Capítulo VI: Anexos	69

Índice de figuras

Fig. 1.1 - Valores médios das últimas safras de café em diferentes áreas, entre os anos de 2006 a 2010.....	3
Fig. 1.2 - Uredósforo de <i>Hemileia vastatrix</i> , onde é visível uma zona lisa e uma zona equinolada.....	7
Fig. 1.3 - Pústulas de soros uredospóricos na página inferior da folha do cafeeiro	8
Fig. 1.4 - Representação do ciclo de vida das ferrugens macrocíclicas.	9
Fig. 1.5 - Representação do ciclo de vida do fungo <i>Hemileia vastatrix</i> , responsável pela ferrugem alaranjada do cafeeiro. Na figura é possível visualizar as estruturas formadas no ciclo de vida (uredósporos, teleutósporos e basidiósporos), e os efeitos na planta do café, que resultam na queda prematura das folhas do cafeeiro.....	10
Fig. 1.6 - Apresentação das estruturas de infecção de <i>Hemileia vastatrix</i> , em tecidos foliares de <i>Coffea arabica</i>	11
Fig. 1.7 - Soros uredospóricos de <i>Hemileia vastatrix</i> 20 dias após inoculação.....	11
Fig. 1.8 - Representação da disposição dos eléctrodos num aparelho de Counter-Clamped Homogeneous Electric Field (CHEF)..	15
Fig. 1.9 - Representação da técnica de Fluorescence <i>in situ</i> Hybridization (FISH) com a hibridação do DNA alvo e da sonda complementar e posterior detecção do sinal da sonda por imunodeteção	19
Fig. 2.1 - Conservação de uredósporos de <i>Hemileia vastatrix</i> em cápsulas de gelatina.....	24
Fig. 2.2 - Germinação em água dos esporos de <i>Hemileia vastatrix</i>	24
Fig. 2.3 - Esquema da germinação nas membranas de polipropileno dos esporos de <i>Hemileia vastatrix</i>	25
Fig. 2.4 - Equipamento do Counter-Clamped Homogeneous Electric Field (CHEF).	29
Fig. 2.5 - Marcação do DNA plasmídico, através da metodologia de Biotin Nick Translation (Roche).	32

Fig. 3.1 - Núcleos observados em uredósporos e tubos germinativos de <i>Hemileia vastatrix</i> após germinação em água e coloração do DNA com DAPI.....	40
Fig. 3.2 - Identificação das diferentes estruturas formadas, durante a germinação <i>in vitro</i> , em membranas de polipropileno artificiais do isolado 1065 de <i>Hemileia vastatrix</i> ..	41
Fig. 3.3 - Apressórios de <i>Hemileia vastatrix</i> com dois e quatro núcleos no interior, após coloração do DNA nuclear com DAPI.....	43
Fig. 3.4 - Quebra incompleta dos tubos germinativos do isolado 71 de <i>Hemileia vastatrix</i> , com libertação parcial do material nuclear para a lâmina após a aplicação do método do rebentamento dos tubos germinativos e coloração do DNA nuclear com DAPI	44
Fig. 3.5 - Rebentamento do tubo germinativo para o isolado 1065 de <i>Hemileia vastatrix</i>	45
Fig. 3.6 - Identificação das diferentes fases do ciclo celular para <i>Hemileia vastatrix</i> , após a aplicação do método do método do rebentamento dos tubos germinativos e coloração do DNA nuclear com DAPI.	46
Fig. 3.7 - Identificação de diferentes níveis de condensação de cromossomas metafásicos, do isolado 71 de <i>Hemileia vastatrix</i> , após a aplicação do método do rebentamento dos tubos germinativos e coloração do DNA com DAPI.....	47
Fig. 3.8 - Observação no visível de protoplastos do isolado 1065 de <i>Hemileia vastatrix</i> ..	48
Fig. 3.9 - Electroforese em gel de campo pulsado para a separação de cromossomas de baixo/médio tamanho molecular de <i>Hemileia vastatrix</i>	50
Fig. 3.10 - Electroforese em gel de campo pulsado para a separação de cromossomas de elevado tamanho molecular de <i>Hemileia vastatrix</i>	51
Fig. 3.11 - Resultado de Dot-Blot, para as sondas ABM1 e ABM2. O aparecimento de uma zona escura nos dois casos confirma a presença da biotina.....	53
Fig. 3.12 - Confirmação do tamanho molecular das sondas ABM1, ABM2 e respectivos plasmídeos.	54
Fig. 3.13 - Localização de rDNA na zona do nucléolo em núcleos interfásicos de <i>Hemileia vastatrix</i> , sujeitos ao método do rebentamento dos tubos germinativos e Fluorescence <i>in situ</i> Hybridization (FISH).	55

Índice de tabelas

Tabela 1.1 - Representação da técnica de Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) em alguns fungos fitopatogénicos, na determinação do tamanho do genoma e tamanho médio dos cromossomas.....	16
Tabela 2.1 - Isolados e raças fisiológicas de <i>Hemileia vastatrix</i> e respectivos hospedeiros e locais de origem.	23
Tabela 2.2 - Programa executado no termociclador, para incubação das amostras sujeitas ao protocolo de Fluorescence <i>in situ</i> Hybridization (FISH) durante a noite.	35

Lista de abreviaturas

An - Âncora

Ap - Apressório

BCIP - 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate

BSA - Albumina de soro de Bovino

CHEF - Contoured-clamped homogeneous electric field

CIFC - Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro

CMH – Célula-Mãe do Haustório

DAPI - 6- diamino-2- fenilindole

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

FISH - Fluorescence *in situ* hybridization

GTBM - Germ Tube Burst Method

H - haustório

HDT - Híbrido de Timor

Hp – Hifa de penetração

IICT - Instituto de Investigação Científica Tropical

ITQB - Instituto de Tecnologia Química e Biológica

LB - Luria-Bertani

MTSB - Microtubule Stabilizing buffer

NOR - Regiões do Organizador nucleolar

NTBP - Nitro - Blue tetrazolium

PCB – Plant Cell Biology

PCR – Polymerase Chain Reaction

PFGE - Pulsed Field Gel Electrophoresis

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

SSC - Saline Sodium Citrate

TAE - Tris - Acetato EDTA

TBE - Tris- Borato EDTA

Capítulo I: Introdução

Introdução

O café ocupa o segundo lugar na lista de produtos naturais mais importantes no mercado internacional, logo depois do petróleo e representa uma importante fonte de receitas para a economia dos países produtores. O cultivo, processamento, transporte e comercialização do café são responsáveis por milhões de postos de trabalho em todo o mundo. Desta forma, a produção de café ajuda a desenvolver a economia de países em desenvolvimento e pode servir para lançar a economia de outras regiões (ICO, Annual Review 2009/2010).

No séc. XX verificou-se um aumento da produção e consumo do café, destacando-se como principal área de produção a América do Sul, em grande parte devido ao Brasil e à Colômbia, que são os principais produtores mundiais de café.

Na Fig. 1.1 são apresentados os valores médios das últimas safras de café entre os anos 2006 e 2010, em quatro áreas do globo terrestre, das quais se distinguem os principais produtores, mencionados anteriormente. No séc. XXI e principalmente nos anos de 2009 e 2010, em resultado da crise económica, verificou-se um ligeiro decréscimo do consumo de café (ICO, Annual Review 2009/2010; <http://dev.ico.org/prices/po.htm>).

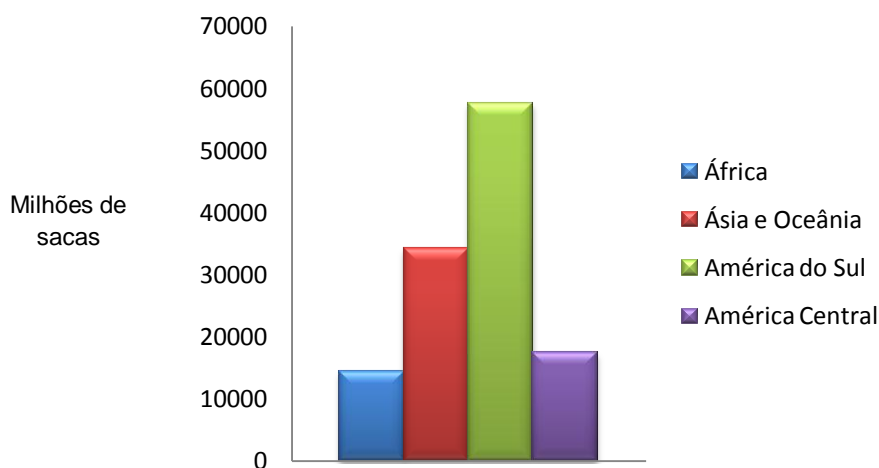


Fig. 1.1 - Valores médios das últimas safras de café em diferentes áreas, entre os anos de 2006 a 2010 (ICO, Annual Review, 2009/2010) (1 saca = 60Kg).

Uma das doenças mais importantes que afecta a principal espécie de cafeeiro cultivado (*Coffea arabica* L.) é a ferrugem alaranjada, provocada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome. Na ausência de medidas de controlo da doença, a ferrugem alaranjada pode ser responsável por grandes perdas de produção, podendo afectar plantações inteiras, limitando o crescimento e desenvolvimento dos cafeeiros. As quebras na produção de café podem atingir valores entre os 10 - 40 % e os prejuízos na economia global são estimados entre 1 a 2 biliões de dólares anualmente (McCook, 2008; Silva *et al.*, 2006).

A importância económica da ferrugem alaranjada torna essencial o conhecimento da biologia do agente patogénico, para uma melhor compreensão da interacção entre o fungo e o hospedeiro,

permitindo, em estudos subsequentes, a selecção de genótipos de cafeeiro com resistência durável a esta doença (Silva *et al.*, 2006).

O presente trabalho foi realizado no âmbito do projecto PTDC/AGR-GPL/114949/2009 financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia intitulado “A perspectiva do patogénio das interacções moleculares planta - microrganismo: genes expressos durante o processo de infecção da ferrugem alaranjada do cafeeiro - *Hemileia vastatrix*”, em curso no Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro/Instituto de Investigação Científica Tropical (CIFC/IICT) e no Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB).

Objectivos

O principal objectivo deste trabalho foi estabelecer o cariótipo da espécie *H. vastatrix*. O estabelecimento do número de cromossomas desta espécie foi feito com recurso a duas técnicas distintas mas complementares: uma citológica baseada na metodologia do rebentamento dos tubos germinativos e outra electroforética, utilizando a electroforese em campo pulsado. Estas técnicas foram pela primeira vez aplicadas ao estudo do cariótipo de *H. vastatrix*. O desenvolvimento de ambas contribuirá para a caracterização do cariótipo da espécie *H. vastatrix*, com vista a uma posterior utilização em isolados provenientes de diferentes raças fisiológicas com distintos espectros de virulência, bem como para a potencial identificação de cromossomas supranumerários.

Para além da determinação do número de cromossomas, outro objectivo deste trabalho foi a implementação da técnica de hibridação *in situ* (Fluorescence *in situ* Hybridization - FISH) para o fungo *H. vastatrix*, para posterior aplicação em estudos de identificação de genes, em especial genes ligados à patogenicidade.

1. Ferrugem alaranjada do cafeeiro

1.1 Hospedeiro: cafeeiro

1.1.1 Origem

O género *Coffea* é originário de África, mais precisamente da zona do golfo da Guiné, tendo-se posteriormente disseminado por toda a África tropical (Anthony *et al.*, 2010). A espécie *Coffea arabica* originária da Etiópia (Montagnon & Bouharmont, 1996) foi transportada e domesticada no Iémen pelo Homem. Esta espécie foi, posteriormente, levada por Europeus, em particular franceses, holandeses e ingleses para diversas colónias no sub-contidente indiano, sudeste asiático e ilhas do Índico. No séc. XVIII foi introduzida no continente Americano e no séc. XIX foi reintroduzida em África. Este processo limitou a diversidade genética do cafeeiro Arábica, admitindo-se que todas as plantas cultivadas actualmente descendam de uma única planta enviada para o Jardim Botânico de Amsterdão (Berthaud & Charrier, 1988; Lashermes *et al.*, 1996).

1.1.2 Classificação taxonómica e características gerais do cafeeiro

O cafeeiro Arábica foi descrito pela primeira vez em 1713 por Antoine Laurent Jussieu, com o nome de *Jasminum arabicanum*. Em 1737, Lineu catalogou esta planta num novo género, o género *Coffea*, sendo *C. arabica* a única espécie conhecida na altura (Charrier & Berthaud, 1985).

Em 2006, Davis e os seus colaboradores, classificaram o género *Coffea* dentro da família *Rubiaceae*, subfamília *Ixoroideae*. Este género encontra-se dividido em três subgéneros: *Coffea*, *Baracoffea* e *Philanthopsis* (Andreasen & Bremer, 2000; Davis *et al.*, 2006; Davis *et al.*, 2007). No subgénero *Coffea* encontramos as espécies economicamente mais importantes: *C. arabica* (cafeeiro Arábica) e *C. canephora* Pierre ex Frohener (cafeeiro Robusta) (Clifford & Willson, 1985; Davis *et al.*, 2006; Teixeira *et al.*, 1979).

Apesar de ambas as espécies de *Coffea* pertencerem ao mesmo subgénero, apresentam diferenças significativas entre si. A espécie *C. arabica* é cultivada em regiões de temperaturas amenas (15 - 24 °C) e elevada altitude (entre os 1000 e 3000 m) (Aguiar *et al.*, 2005; http://www.ico.org/pt/botanical_p.asp). Esta espécie é uma excepção dentro do género *Coffea*, uma vez que é o único poliplóide natural ($2n = 4x = 44$) e multiplica-se por autogamia (Aguiar *et al.*, 2005). Todas as outras espécies deste género, nomeadamente *C. canephora* são diplóides ($2n = 22$) e multiplicam-se por fecundação alogâmica (Maglio, 2006; Teixeira *et al.*, 1979). Esta espécie é cultivada em regiões até aos 1300 m de altitude e com temperaturas mais elevadas (24 - 30 °C) (Teixeira *et al.*, 1979).

Quanto às características da bebida, o café Arábica contém menor teor em cafeína (0,8 - 1,4 %), é mais ácido e aromático e tem maior cotação no mercado. O café Robusta apresenta maior teor em cafeína (1,7 - 4,0 %) sendo consequentemente mais amargo e possui mais corpo, tendo uma qualidade inferior e menor cotação no mercado (http://www.ico.org/pt/botanical_p.asp).

1.2 Agente patogénico: *Hemileia vastatrix* Berk. & Br.

1.2.1 Origem e distribuição geográfica

O fungo *H. vastatrix* é um parasita obrigatório do género *Coffea* (McCook, 2008), cuja presença foi identificada pela primeira vez em 1861 perto do Lago Vitória, na zona leste de África (Rodrigues, 1990; Silva *et al.*, 2006). A expansão da ferrugem alaranjada ocorreu com a disseminação do fungo desta região para o Ceilão (actual Sri Lanka), onde os sintomas da doença foram observados pela primeira vez em 1869, pelo botânico G.H.K. Thwaites que os descreveu como um conjunto de pequenas manchas descoradas presentes na página inferior das folhas do cafeeiro, facilmente identificáveis ao microscópio e distintos dos esporos de outras espécies de fungos conhecidos até à data (1874) (citado por Rodrigues, 1990). Nesta altura, o Ceilão era o terceiro maior exportador mundial de café e quinze anos depois de ter sido detectada a presença da ferrugem nas culturas, a indústria desta ilha entrou em colapso (McCook, 2008).

A ferrugem do cafeeiro foi referida no século XIX em Madagáscar (1872), Java (1876), Colónias Inglesas de Natal (1878) e nas ilhas Fiji (1879). No séc. XX, mais precisamente entre 1920 e 1950, a ferrugem torna-se endémica nas zonas da Ásia, Pacífico e este de África (McCook, 2006). Na década de 50 e 60 a epidemia atingiu o oeste do continente africano, mais concretamente os dois maiores produtores, Costa do Marfim (1954) e Angola (1966).

O reconhecimento do trabalho desenvolvido pelo Prof. Branquinho D' Oliveira nos anos 50 e o receio da introdução da doença no continente Americano demonstrada pelo governo dos Estados Unidos da América, levou em 1955 à criação do Centro de Investigação da Ferrugem do Cafeeiro (CIFC). Este centro resultou da cooperação directa entre o governo Português e dos Estados Unidos da América, tendo como objectivo a caracterização de diferentes raças de *H. vastatrix*, com vista à selecção e distribuição de variedades de cafeeiro resistentes (Rodrigues, 1992).

No ano de 1970 a ferrugem do cafeeiro foi detectada no Brasil, mais especificamente no Estado da Bahia, em culturas de cafeeiro abandonadas (McCook, 2006). Em apenas 14 anos, o fungo espalhou-se pela América do Sul e Central (McCook, 2008; Schieber & Zentmyer, 1984). Nos anos que se seguiram, continuaram a surgir surtos da doença e actualmente está disseminada em praticamente todos os países produtores do cafeeiro Arábica.

1.2.2 Taxonomia

O género *Hemileia* foi descrito pela primeira vez por Berkeley e Broome em 1869, sendo classificado desta forma, devido à forma dos uredóporos, que apresentam uma face lisa e outra equinolada (*Hemi*, meio e *leia*, lisa) (Fig. 1.2). Este género abrange cerca de 40 espécies, todas de origem tropical e responsáveis por infectar monocotiledóneas e dicotiledóneas, em particular as plantas pertencentes à família das Rubiáceas, da qual faz parte o género *Coffea* (Rodrigues, 1990). Neste género, as plantas com elevado interesse económico, são infectadas por duas espécies: *Hemileia coffeicola* Maubl & Roger e *H. vastatrix*. A primeira ocorre apenas na África ocidental afectando a espécie *C. canephora*. A espécie *H. vastatrix* é considerada economicamente mais importante do que esta última, devido aos elevados prejuízos por que é responsável nas culturas de café (McCain & Hennen, 1984; Rodrigues *et al.*, 1975; Rodrigues, 1990; Waller, 1985).



Fig. 1.2 - Uredósporo de *Hemileia vastatrix*, onde é visível uma zona lisa e uma zona equinolada. Imagem de Microscopia Electrónica de Varrimento (x2560) (Azinheira, 2005).

A classificação taxonómica actualmente aceite para *H. vastatrix* é a seguinte (www.indexfungorum.org):

Reino: *Fungi*

Filo: *Basidiomycota*

Classe: *Puccinioniomycetes*

Ordem: *Pucciniales*

Família: *Incertae sedis*

Género: *Hemileia*

Espécie: *Hemileia vastatrix*

1.2.3 Sintomatologia

A infecção provocada pelo fungo *H. vastatrix* manifesta-se através do aparecimento de pústulas de soros uredospóricos de cor laranja na página inferior das folhas do cafeeiro (Rijo & Rodrigues, 1978; Wellman, 1957). Numa fase inicial dos sintomas, surgem pequenas manchas cloróticas que apresentam entre 1 e 3 mm de diâmetro e que antecedem a esporulação. Em poucos dias, as manchas cloróticas aumentam de número e de diâmetro, resultando na formação de pústulas de soros uredospóricos de cor alaranjada (Fig. 1.3). A infecção provocada por este fungo afecta as folhas jovens e as folhas mais velhas do cafeeiro (Schieber & Zentmyer, 1984). As consequências desta infecção traduzem-se na queda prematura das folhas, na diminuição da taxa de fotossíntese e diminuição da produção da planta (Agrios, 2005; Silva *et al.*, 2006).

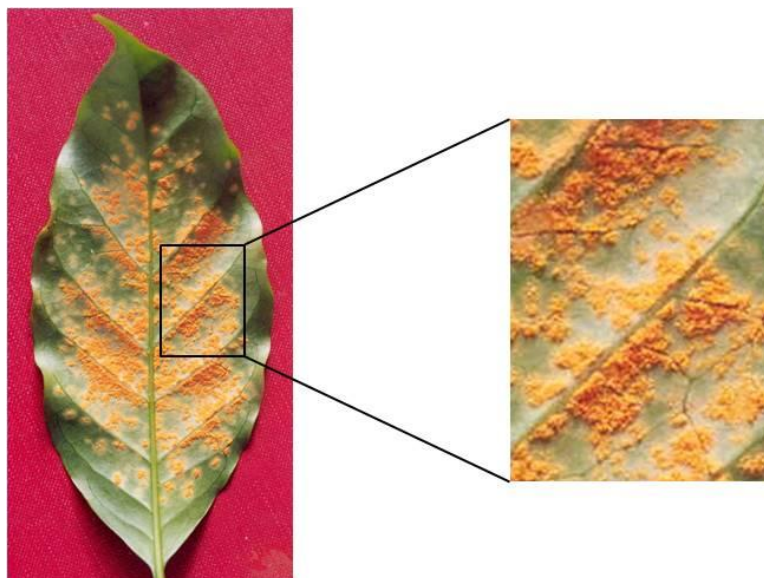


Fig. 1.3 – Pústulas de soros uredospóricos na página inferior da folha do cafeeiro (adaptado de Silva *et al.*, 2006).

1.2.4 Ciclo de vida

A maioria das ferrugens tem ciclos de vida complexos designados por macrocíclicos devido à produção de cinco tipos de esporos, e heteróicos pois são necessários dois hospedeiros distintos para o ciclo se complementar. O ciclo de vida tem início com a germinação dos teleutósporos (células diploides, $2n$ cromossomas) (Fig. 1.4A) nas quais se dá a fusão nuclear (por cariogamia) da qual resulta o basídio ($2n$), que por sua vez sofre meiose e vai produzir quatro basidiósporos (n) (Fig. 1.4B). Estas estruturas haplóides são frágeis e no caso das ferrugens heteróicas, não infectam os hospedeiros dos teleutósporos, sendo libertados e transportados pelo ar principalmente durante a noite. Ao invadirem os novos tecidos, são responsáveis pela produção de colónias haplóides, designadas ecidiúlos (Fig. 1.4C), onde se encontram os gâmetas. A seguir à fertilização, também denominada de plasmogamia, cada célula passa a possuir dois núcleos haplóides ($n+n$) dando origem aos éciosporos (Fig. 1.4D). Estes esporos germinam rapidamente e produzem o micélio do qual surge os uredósporos ($n+n$) (Fig. 1.4E). Esta é a fase mais familiar para os fitopatologistas porque é a única com capacidade de repetição no mesmo hospedeiro e em poucas gerações pode provocar uma epidemia. Os uredósporos são responsáveis pela infecção dos tecidos e pela produção de teleutósporos ($n+n$) (Fig. 1.4F), que posteriormente sofrem cariogamia originando células diplóides ($2n$) completando, desta forma, o ciclo de vida das ferrugens (Agrios, 2005; Kolmer *et al.*, 2009).

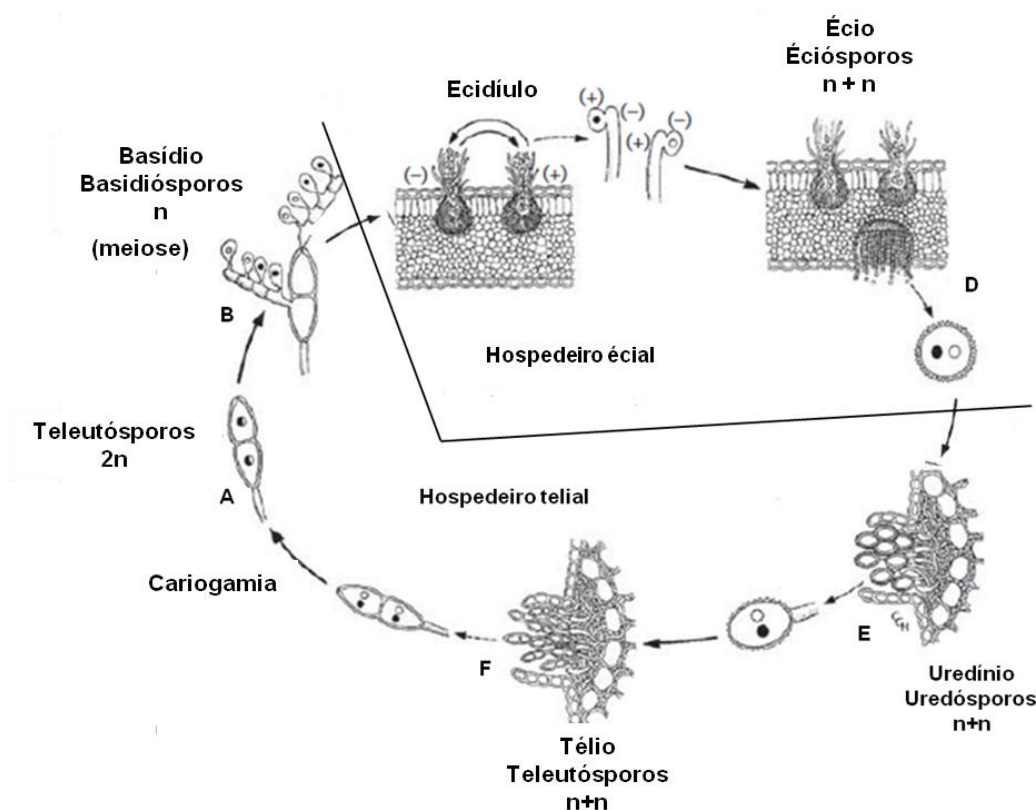


Fig. 1.4 - Representação do ciclo de vida das ferrugens macrocíclicas. **(A)** Teleutósporo diplóide; **(B)** Basídio e basidiósporos; **(C)** Picnío; **(D)** Fase Écial; **(E)** Uredósporos; **(F)** Têlio (adaptado de Kolmer *et al.*, 2009).

O ciclo de vida descrito na Fig. 1.4 é comum a muitas ferrugens, no entanto a maioria evoluiu no sentido de realizarem ciclos mais curtos e no mesmo hospedeiro, designados de autóicos e do qual faz parte o ciclo de vida de *H. vastatrix* (Kolmer *et al.*, 2009). A evolução surgiu por um lado para ultrapassar a obrigatoriedade da existência de hospedeiros diferentes nas proximidades e como resposta às variações das condições ambientais onde o cafeeiro foi introduzido nomeadamente: altitude, latitude e seca que levou ao encurtamento do seu ciclo de vida (Savile, 1953).

O ciclo biológico de *H. vastatrix* divide-se em duas fases distintas: uma fase dicariótica e outra monocariótica (Agrios, 2005). Na primeira fase, ocorre a formação de uredósporos dicarióticos que representam a fase assexuada do ciclo e sempre que as condições ambientais são favoráveis, são responsáveis pelo processo de infecção no cafeeiro (Agrios, 2005; Silva *et al.*, 2006). Os teleutósporos são formados ocasionalmente e ocorrem nos mesmos soros dos uredósporos (Ward, 1882), aparecendo excepcionalmente em condições de chuva moderada e baixas temperaturas e infectando outros cafeeiros, devido à acção do vento e de outros agentes (Fernandes *et al.*, 2009; Kolmer *et al.*, 2009). Os basidiósporos são monocarióticos, não infectam o cafeeiro e representam a fase sexuada do ciclo (Agrios, 2005), não sendo conhecida nenhuma função para estas estruturas ou hospedeiro (Fernandes *et al.*, 2009). Na Fig. 1.5 está representado o ciclo de vida do fungo *H. vastatrix*, onde é possível visualizar as estruturas formadas durante o mesmo, os sintomas no cafeeiro e o processo de reinfeção.

O ciclo de vida desta ferrugem não é conhecido na totalidade, o que dificulta a compreensão da evolução deste agente patogénico. Uma melhor compreensão do ciclo de vida, teria implicações no melhor conhecimento da biologia do fungo e dos mecanismos de criação de diversidade genética, e assim, no controlo da doença pela utilização de variedades de cafeeiros resistentes à ferrugem (Fernandes *et al.*, 2009).

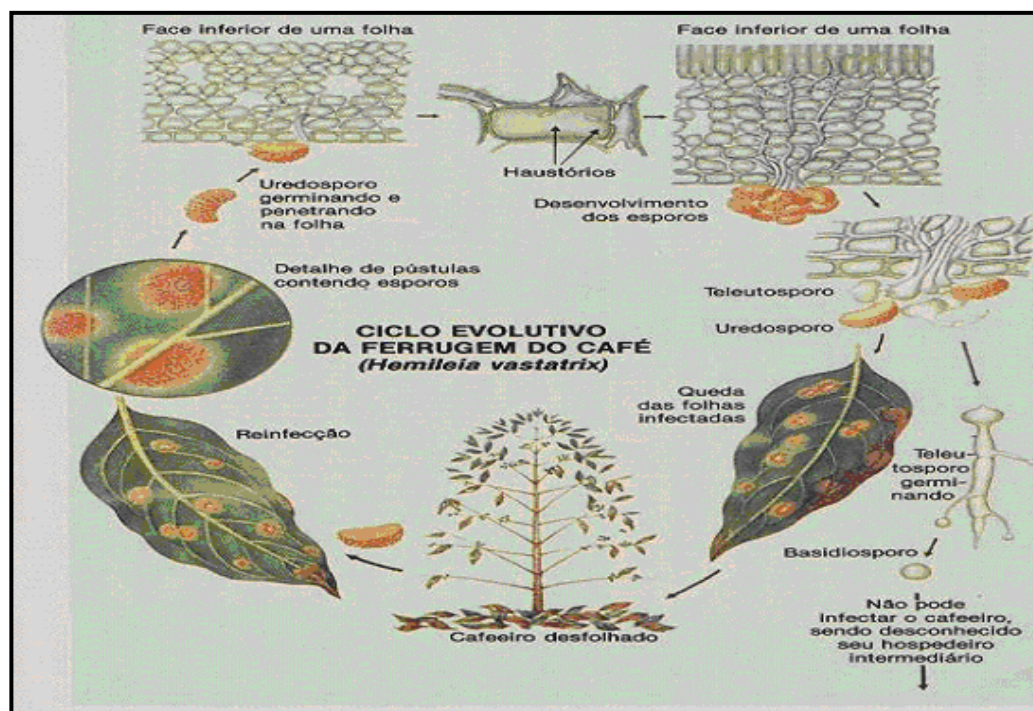


Fig. 1.5 - Representação do ciclo de vida do fungo *Hemileia vastatrix*, responsável pela ferrugem alaranjada do cafeeiro. Na figura é possível visualizar as estruturas formadas no ciclo de vida (uredósporos, teleutósporos e basidiósporos), e os efeitos na planta do café, que resultam na queda prematura das folhas do cafeeiro (http://www.uesb.br/professor/arminio/fitopatologia/slides/doencas_do_cafe_arquivos/slide0003_image012.jpg).

1.3 Processo de infecção

O fungo *H. vastatrix* é um fungo biotrófico que depende dos tecidos da planta do café para a sua sobrevivência e reprodução (Silva *et al.*, 2006). O processo de infecção tem início com a germinação dos esporos responsáveis pela doença, os uredósporos, na página inferior da folha, na presença de água e temperatura adequada, que pode variar entre 15 - 30 °C, sendo a temperatura ótima de 24 °C (Nutman *et al.*, 1963).

Após a formação do tubo germinativo, ocorre a diferenciação de um apressório sobre o estoma e a sua posterior penetração na câmara subestomática por intermédio de uma hifa de penetração (Fig. 1.6A). A hifa vai desenvolver duas ramificações laterais em forma de âncora (Fig. 1.6B) e em cada braço é produzida uma hifa especializada designada de célula-mãe do haustório, que vai originar um haustório, responsável pela infecção das células subsidiárias do estoma (Fig.

1.6C). O processo de infecção evolui com a produção subsequente de hifas intercelulares no mesófilo e com a consequente formação de mais células-mãe do haustório e haustórios nas células do mesófilo (Rijo & Rodrigues, 1978; Silva *et al.*, 1999).

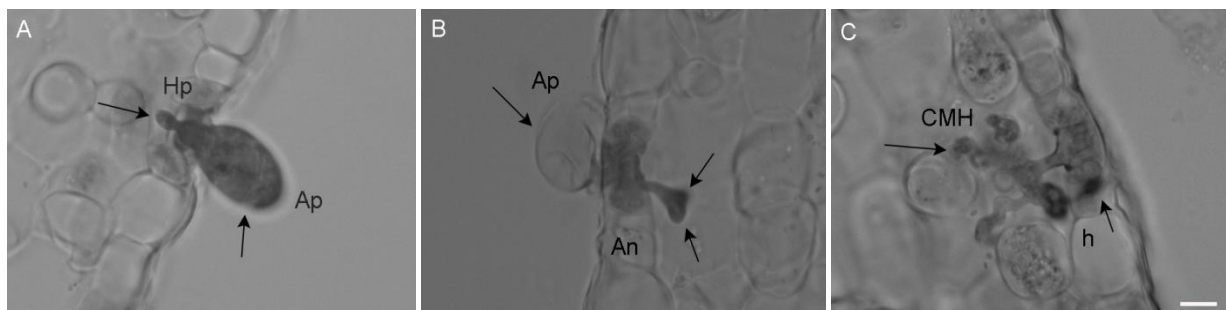


Fig. 1.6 - Apresentação das estruturas de infecção de *Hemileia vastatrix*, em tecidos foliares de *Coffea arabica*. **(A)** Fase da hifa de penetração (Ap - apressório; Hp - hifa de penetração) (24 h após inoculação) (x400); **(B)** Fase de âncora na amostra (Ap - apressório; An - âncora) (24 h após inoculação) (x400); **(C)** Fase da célula-mãe do haustório, com haustório infectando as células subsidiárias (CMH – Célula - Mãe do haustório; h - haustório) (72 h após inoculação) (x400) (A e C - Cafeeiro H152/3; B - H147/1). Escala: 20 µm.

Após 20 dias do início do processo de infecção, ocorre na área de penetração da hifa a formação de uma grande densidade micelial, surgindo para o exterior através dos estomas, um soros uredospórico em forma de “bouquet” (Fig.1.7) (Rijo & Rodrigues, 1978; Silva *et al.*, 2006).



Fig. 1.7 - Soros uredospóricos de *Hemileia vastatrix* 20 dias após inoculação. Imagem de Microscopia Electrónica de Varrimento (x700) (Silva *et al.*, 2006).

1.4 Disseminação dos esporos de *H. vastatrix*

A disseminação dos uredósporos de *H. vastatrix* pode ser feita através do vento, da chuva ou por alguns animais, como por exemplo, os insectos. Para além destes factores ambientais, destaca-se ainda a acção do Homem na propagação de plantas infectadas entre diversos países do mesmo continente ou de continentes diferentes, ao longo dos séculos XIX e XX (Agrios, 2005; McCook, 2008).

1.5 Luta genética

O controlo da ferrugem do cafeeiro, feita através da aplicação de fungicidas (cúpricos ou sistémicos), acarreta elevados custos económicos e ambientais. Para evitar os custos e desvantagens deste meio de controlo e devido à importância económica do café a nível mundial, o cultivo de plantas resistentes a esta doença (luta genética), representa uma alternativa económica e ambientalmente sustentável.

A interacção entre o cafeeiro e *H. vastatrix* é feita de acordo com a teoria gene-a-gene de H. Flor, na qual existe o reconhecimento dos genes de virulência das diferentes raças do fungo, por parte dos factores de resistência do cafeeiro (Bettencourt, 1981). No desenvolvimento de cafeeiros resistentes à ferrugem destacam-se as populações de Híbrido de Timor (HDT), que apresentam resistência a todas ou à maioria das raças de ferrugem conhecidas (Diniz *et al.*, 2012). Em Portugal, mais precisamente no CIFC, o HDT foi usado como progenitor resistente, em programas de melhoramento. A descendência seleccionada foi cruzada com outras variedades de cafeeiros (como é o caso de: Catuai, Caturra e Mundo Novo), de forma a criar linhas resistentes à ferrugem e com valor comercial (McCook, 2008; Silva *et al.*, 2006). Os híbridos obtidos nos cruzamentos com o HDT, permitiram obter avanços na selecção de plantas agronomicamente úteis e com resistência à ferrugem, destacando-se o Catimor (descendente do cruzamento entre HDT e Caturra) e Sarchimor (descendente do cruzamento HDT e Villa-Sarchi), que foram posteriormente seleccionados em diferentes zonas da América do Sul (Brasil e Costa Rica) e Ásia (Índia) (Silva *et al.*, 2006).

Os mecanismos de resistência no genótipo HDT832/2 foram recentemente caracterizados através de estudos celulares e moleculares, verificando-se que a resistência pré-haustorial apresentada por este genótipo (em contraste com a resistência pós-haustorial mais frequentemente verificada nas interacções incompatíveis cafeeiro-ferrugem) apresenta componentes comuns com a resistência não-hospedeira, o que pode explicar a maior durabilidade desta resistência (Diniz *et al.*, 2012).

2. Cariotipagem

O estudo do cariótipo de um organismo é fundamental para a compreensão da organização genómica do mesmo (Tsuchiya & Taga, 2001). A maior parte da informação genética nos eucariotas encontra-se localizada no núcleo da célula (Avery *et al.*, 1944) e várias metodologias foram desenvolvidas durante as décadas de 40 e 50 para determinar e compreender, a variação do tamanho do genoma e o seu significado biológico (Avery *et al.*, 1944; Dolezel & Greilhuber, 2010). Na década de 1940 foram utilizadas metodologias que permitiam medir a absorvância de luz nos núcleos, recorrendo à luz UV e ao corante de Feulgen para corar os respectivos núcleos, permitindo observar em diferentes células, diferentes quantidades de DNA (Ris & Mirsky, 1949; Swift, 1950). No início da década seguinte, estudos bioquímicos e citotóxicos foram realizados para determinar a quantidade de DNA durante a divisão mitótica e a meiose em células tumorais humanas (Stowell, 1945; Stowell, 1946). A determinação do genoma em eucariotas, particularmente de fungos fitopatogénicos ascomicetas foi alvo de diversos estudos. A determinação do genoma de fungos como *Beauveria bassiana* (Viaud *et al.*, 1996), *Botrytis cinerea* (Vallejo *et al.*, 1996, 2002) e *Verticillium dahliae* (Panteu & Typas, 2005), permitiu determinar a existência de polimorfismos genéticos entre os isolados de cada espécie, referentes a variações no tamanho e número de cromossomas. Estas diferenças são comuns em fungos, permitindo a identificação de cromossomas extra, que não fazem parte da constituição normal de um organismo (Mills & McCluskey, 1990; Zolan, 1995). A identificação destes cromossomas, designados de cromossomas supranumerários é de especial importância uma vez que podem conter genes essenciais envolvidos nas interações fungo - hospedeiro (Covert, 1998).

Barbara McClintock, foi pioneira no estudo do cariótipo de fungos filamentosos ao observar por microscopia do visível os cromossomas do fungo *Neurospora crassa*, com recurso a vários corantes de DNA nomeadamente a acetorceína, acetocarmina e orceína lacto-acética, estimando um número de $n = 7$ (McClintock, 1945). O corante acetorceína também foi utilizado na observação dos outros fungos ascomicetas como *Tuber aestivum* (Poma *et al.*, 1998), *Erysiphe graminis* (Borbye *et al.*, 1992) e *E. pisi* (Singh *et al.*, 1984).

Chinnappa e Sreenivasan, em 1965, atribuíram ao cariótipo de *H. vastatrix* $n = 14$, partindo da observação de teleutósporos germinados *in situ*, fixados em lâminas de vidro com ácido propiónico e álcool etílico e corados durante 24 h com uma solução alcoólica de HCl carmina. Contudo os autores registaram a dificuldade em apontar um número definitivo de cromossomas, devido à falta de nitidez das observações.

A caracterização cariológica de fungos sofreu um novo avanço com a introdução do método de rebentamento dos tubos germinativos (GTBM – Germ Tube Burst Method). Esta técnica apresentou-se como uma metodologia mais simples que as anteriores uma vez que simplificou os pré-tratamentos necessários à visualização dos cromossomas. Mais recentemente, a Microscopia Electrónica de Varrimento foi utilizada num estudo publicado por Tsuchiya e colaboradores, no qual é possível observar a estrutura tridimensional dos cromossomas e dos núcleos dos fungos ascomicetas: *Cochiobolus heterostrophus* e *N. crassa* (Tsuchiya *et al.*, 2004).

A observação de cromossomas de fungos apresenta limitações, relacionadas com o reduzido tamanho dos cromossomas de fungos e com a dificuldade em observar cromossomas metafásicos (Rodríguez-García *et al.*, 2006). Para ultrapassar estas dificuldades, o desenvolvimento em 1983 da técnica de electroforese em gel de campo pulsado (PFGE – Pulsed Field Gel Electrophoresis) permitiu determinar o cariótipo de organismos difíceis de estudar através de técnicas citológicas, aumentando o número de cariótipos estudados (Rodríguez-García *et al.*, 2006; Taga *et al.*, 1998).

2.1 Caracterização citológica: Método do rebentamento dos tubos germinativos (GTBM - Germ Tube Burst method)

O procedimento de rebentamento dos tubos germinativos foi desenvolvido em 1988 por Shirane e colaboradores com o objectivo de espalhar e visualizar os cromossomas metafásicos do fungo fitopatogénico *Botrytis cinerea*. Para tal, os tubos germinativos ou as hifas deste organismo eram fixos em lâminas de vidro e depois sujeitos a um tratamento com metanol e ácido acético glacial, para provocar o rebentamento dos tubos e libertar o conteúdo dos mesmos. A coloração com Giemsa¹ permitiu visualizar os cromossomas metafásicos espalhados na lâmina de vidro. Em 1989, Shirane e colaboradores estabeleceram o método de GTBM para a determinação do número de cromossomas de cinco espécies de *Botrytis* (*B. cinerea*, *B. allii*, *B. byssoidea*, *B. squamosa* e *B. tulipae*). Desde então, esta técnica tem sido aplicada em muitos fungos, como é o caso de *Nectria haematococca* (Taga *et al.*, 1998), *Mycosphaerella graminicola* (Mehrabi *et al.*, 2007), *Cochliobolus heterostrophus* (Taga *et al.*, 2003; Tsuchiya & Taga, 2001), *Haematonectria haematococca* (Taga *et al.*, 2003), *Alternaria alternata* (Taga & Murata, 1994) e *Collectotrichum acutatum* (Garrido *et al.*, 2009).

O GTBM ao espalhar os cromossomas nas lâminas de vidro vai permitir a contagem dos cromossomas e sua caracterização morfológica (Tsuchiya & Taga, 2001). As limitações desta técnica estão relacionadas com a dificuldade na determinação do tamanho preciso dos cromossomas e com a necessidade de optimização da amostra com vista a uma maximização do número de células em metafase (Taga *et al.*, 1998).

2.2 Caracterização electroforética: Electroforese em gel de campo pulsado (PFGE - Pulsed Field Gel Electrophoresis)

A técnica de PFGE foi desenvolvida, em 1983, por Schwartz & Cantor, com o objectivo de separar os cromossomas de *Saccharomyces cerevisiae*, com tamanhos moleculares entre 200 - 2200 Kb. A equipa de Schwartz pretendia melhorar a separação de moléculas de DNA de grandes dimensões, ultrapassando desta forma, as limitações que existiam numa electroforese convencional

¹ Corante Giemsa é constituído por mistura de azul II (mistura equimolar de azul I e azul de metileno) e eosinato de azul II (corante formado pela combinação equimolar de azul I, azul de metileno e eosina amarela).

(Herschleb *et al.*, 2007). Para tal, Schwartz e os seus colaboradores desenvolveram um aparelho com alterações periódicas do campo eléctrico e onde a separação de moléculas de DNA de grandes dimensões, dependia do tempo que as moléculas necessitavam para se reorientarem no gel (Nassonova, 2008).

A metodologia desenvolvida por Schwartz & Cantor foi alvo de várias modificações, da qual resultaram vários aparelhos de electroforese com diferenças na disposição dos eléctrodos e, consequentemente, no ângulo de orientação. A cada aparelho foi atribuído um nome diferente, no entanto, ficou estabelecido que a abreviatura de PFGE seria aplicada a todos os instrumentos em que o princípio do campo pulsado é aplicado. O nome de cada um dos aparelhos é utilizado, dependendo da disposição dos eléctrodos e do ângulo de orientação formado (Anand & Southern, 1990; Nassonova, 2008).

Uma das variantes da metodologia original de Schwartz e Cantor foi desenvolvida por Chu e a sua equipa em 1986, à qual foi atribuída a designação de CHEF (Countour-Clamped Homogeneous Electric Field). Neste aparelho de PFGE, existem eléctrodos dispostos nos lados de um hexágono e dois campos eléctricos que formam um ângulo de 120° (Fig. 1.8). Estas características são responsáveis pela formação de um campo eléctrico homogéneo ao longo de todo o gel (Nassonova, 2008). Actualmente esta é uma das variantes mais usadas de PFGE (Nassonova, 2008), que permitiu a determinação do tamanho e número de cromossomas de muitos organismos difíceis de estudar através de métodos citológicos (Rodríguez-García *et al.*, 2006).

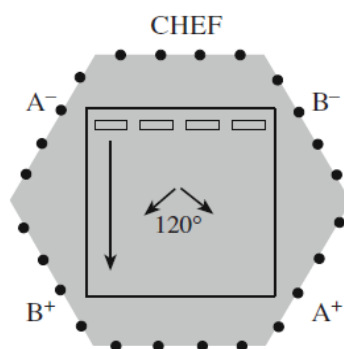


Fig. 1.8 - Representação da disposição dos eléctrodos num aparelho de Counter-Clamped Homogeneous Electric Field (CHEF). (Nassonova, 2008).

Na tabela 1.1 são apresentados alguns exemplos de fungos fitopatogénicos em que foi aplicada a técnica de PFGE, para determinar o tamanho do genoma e dos cromossomas dos mesmos.

Tabela 1.1 - Representação da técnica de Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) em alguns fungos fitopatogénicos, na determinação do tamanho do genoma e tamanho médio dos cromossomas (adaptado de Lukács *et al.*, 2006).

Fungo	Planta hospedeira	Genoma (Mb)	Número de cromossomas/ Tamanho médio dos cromossomas (Mb)
<i>Alternaria alternata</i>	Batateira Feijoeiro	28,8 - 33,6	9 – 11 / 0,4 - 5,7
<i>Cochliobolus sativus</i>	Ervilha Trigo	33	15 / 1,25 - 3,8
<i>Fusarium oxysporum</i>	Tomateiro	26,7	8 / 0,6 - 6,7
<i>Geotrichum candidum</i>	Batateira	11 - 19	5 – 8 / 0,6 - 4,5
<i>Plasmodiophora brassicae</i>	Crucíferas	20,3	16 / 0,68 – 2,2
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Soja, feijão algodão	43,5	16/1,5 - 4,0
<i>Ustilago hordei</i>	Cevada	18,4 - 25,9	16 – 21 / 0,17 - 3,15
<i>Cochliobolus heterostrophus</i>	Milho	50	9 / 2 – 10,3

Na técnica de PFGE, a separação de moléculas de DNA de diferentes tamanhos, depende de vários parâmetros que condicionam a sua mobilidade e separação de acordo com o tamanho molecular (Nassonova, 2008). Os parâmetros são independentes e permitem separar moléculas com tamanhos moleculares inferiores a 1,5 Mb, entre 1,5 - 3,5 Mb e superiores a 3,5 Mb (Rodriguez-García *et al.*, 2006).

O parâmetro mais crítico na separação molecular é o tempo de pulso. Durante este período ocorre a mudança de direcção do campo eléctrico, no qual as moléculas de maiores dimensões necessitam de um tempo maior para mudarem de direcção pois migram mais devagar (Anand & Southern, 1990; Nassonova, 2008).

O ângulo de orientação é outro factor que influencia a separação molecular. O seu valor pode variar entre 90 ° - 180 °, no entanto, em alguns aparelhos de PFGE é fixo. O ângulo escolhido influencia a mobilidade das moléculas, uma vez que em moléculas de maiores dimensões a mobilidade aumenta com a diminuição do ângulo (Nassonova, 2008).

Para além destes dois factores, a eficiência da separação de moléculas de DNA, depende de outras condições como a força do campo eléctrico, a temperatura do tampão e a concentração do gel de agarose. No primeiro caso, ao aumentar o seu valor aumenta a mobilidade e migração molecular e diminuindo, aumenta a resolução (Birren *et al.*, 1988; Chu *et al.*, 1990; Mathew *et al.*, 1988). No caso de um campo eléctrico muito elevado (> 10 V/cm) ocorre o aparecimento de arrastamento e no caso de moléculas de grandes dimensões, poderá provocar a sua mobilização no gel e provocar mudanças

irreversíveis na sua conformação. O campo eléctrico a usar deverá ser mais fraco, ou seja, entre 1 - 3 V/cm (Chu *et al.*, 1990; Gunderson & Chu, 1991; Gurrieri *et al.*, 1999; Mathew *et al.*, 1988).

A migração do DNA no gel também depende da temperatura do tampão utilizado, que em caso de ser muito elevada é responsável por uma maior velocidade de migração. Neste caso as bandas tornam-se difusas e a resolução diminui, podendo acontecer o aparecimento de arrastamentos. Para serem obtidos bons resultados, a temperatura deve ser baixa e tem de estar compreendida entre 12 - 16 °C. O tampão usado deve ainda ter uma força iónica elevada (0,5x TBE ou Tris acetato - 1x TAE). Por último, a concentração do gel de agarose é outro factor relevante na migração molecular. Ao aumentar o seu valor, ocorre a diminuição da velocidade de migração, sendo necessário aumentar o tempo de corrida. Segundo Mathew e colaboradores (1988) ao testar diferentes concentrações no gel de agarose, foi demonstrado que são obtidos melhores resultados num gel de 1,2 % do que 0,9 %.

A técnica de PFGE constituiu um avanço na caracterização cariológica de fungos filamentosos e leveduras (Schwartz & Cantor, 1984), uma vez que pode ser aplicada a vários fungos, independentemente da fase sexual em que se encontra, permitindo observar os cromossomas no gel e ligeiras diferenças entre estes. As limitações subjacentes a esta técnica estão relacionadas com as bandas obtidas, uma vez que as bandas observadas no gel podem não corresponder a cromossomas intactos. Além desta limitação, a técnica de PFGE não revela características morfológicas, sobre a estrutura dos cromossomas. Para determinar o cariótipo, estas limitações devem ser compensadas com observações citológicas, através da realização de outras técnicas como é o caso do GTBM (Taga & Murata, 1994; Wieloch, 2006).

O uso combinado das técnicas de GTBM e PFGE permite contornar as limitações de cada uma. Os resultados de ambas devem ser analisados e comparados, uma vez que a técnica de GTBM permite distinguir cromossomas com tamanho idêntico, que não podem ser separados por PFGE. Estas duas técnicas são complementares e fornecem informações essenciais, para a cariotipagem de uma espécie (Taga *et al.*, 1998).

2.3 Fluorescence *In situ* Hybridization (FISH)

A técnica de hibridação *in situ* foi desenvolvida em 1969 por Gall & Pardue, com o objectivo de mapear e identificar regiões de rDNA em cromossomas de mamíferos. A identificação destas zonas no interior da célula, era feita com recurso a sondas marcadas radioactivamente (Motter & Gobel, 2000). O desenvolvimento de sondas marcadas com fluorocromos representou um avanço nesta técnica, substituindo as sondas radioactivas. Com este passo de marcação a hibridação *in situ*, passou a designar-se por “Fluorescence *In Situ* Hybridization” (Motter & Gobel, 2000). Desde então, inúmeros avanços foram feitos nesta técnica, que marcou a transição da citogenética clássica para a era moderna (Jiang & Gill, 2006).

Actualmente esta ferramenta de trabalho tem um papel fundamental na identificação de sequências específicas de DNA ou RNA em vários genomas (Choi *et al.*, 2002), através da hibridação

destas cadeias alvo com sondas complementares (Tsuchiya & Taga, 2010). As principais vantagens do FISH são: a rapidez de resultados, alta resolução e a capacidade para detectar múltiplos alvos, o que tornou este método muito usado em material animal e vegetal (Tsuchiya & Taga, 2010). Os resultados obtidos dependem da acessibilidade do DNA alvo e do tamanho das sondas usadas (Santos *et al.*, 2006).

No procedimento FISH ocorre a desnaturação do DNA alvo e posterior hibridação com a sonda complementar. A sonda pode ser marcada de duas formas diferentes, que correspondem a dois métodos de FISH distintos: directo e indirecto. No FISH directo, os nucleótidos usados na sonda são marcados com fluóforos, o que evita o passo de detecção. Este método é rápido, sensível e apresenta baixo background nas amostras. No FISH indirecto, os nucleótidos da sonda são conjugados com biotina ou digoxigenina. A visualização do sinal é feita no caso da biotina, através de uma ligação muito forte com a avidina e, no caso da digoxigenina, é usado um anticorpo anti-digoxigenina, acoplado a um fluorocromo. Este método indirecto apresenta algumas desvantagens, uma vez que as amostras podem apresentar algum background e podem ser inconsistentes de amostra para amostra (Svitashev & Somers, 2002; Zarda *et al.*, 1991). As vantagens estão relacionadas com a capacidade de amplificação do sinal, uma vez que podem ocorrer diversas reacções de ligação de anticorpos secundários a diferentes locais do anticorpo primário.

Na Fig. 1.9, é apresentado um esquema que ilustra os passos essenciais desta técnica. Em primeiro lugar ocorre a marcação da sonda de DNA, seguindo-se a desnaturação da mesma e do DNA alvo, de forma a permitir a hibridação das sequências homólogas.

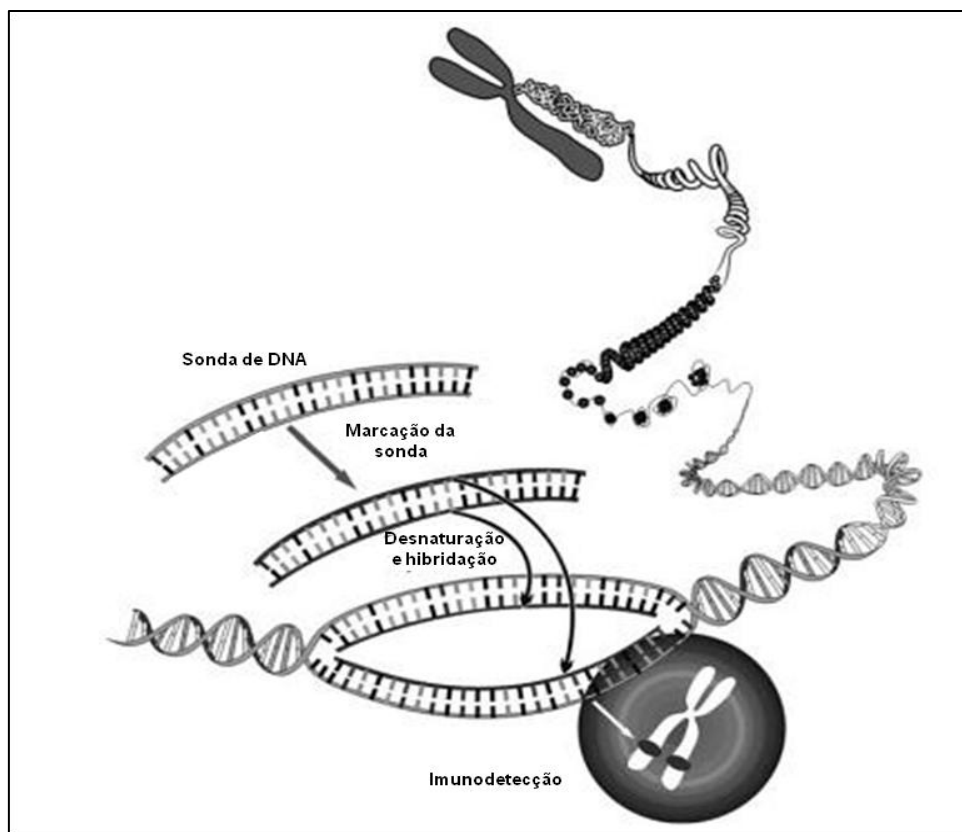


Fig. 1.9 - Representação da técnica de Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) com a hibridação do DNA alvo e da sonda complementar e posterior detecção do sinal da sonda por imunodetecção (Prakash *et al.*, 2010).

A identificação de regiões de rDNA, principal componente do nucléolo, permite entender a estrutura e comportamento do mesmo ao longo do ciclo celular, uma vez que está relacionado com a actividade transcricional destas zonas altamente repetitivas. Nos cromossomas as regiões em que o rDNA se encontra localizado, são designadas de NOR (Regiões do Organizador Nucleolar) (Taga *et al.*, 2003).

A identificação de rDNA em fungos filamentosos pode ser dificultada pelo reduzido tamanho do material biológico a observar. Para estudar o comportamento do rDNA, pode ser destacado o trabalho de Taga e colaboradores (2003) que demonstrou pela primeira vez a dinâmica do rDNA ao longo do ciclo mitótico, em dois fungos filamentosos: *H. haematococca* e *Cochliobolus heterostrophus*. Neste trabalho foram identificados diferentes estados de condensação do rDNA ao longo do ciclo mitótico. Durante a interfase o rDNA não apresentava diferenças no estado de condensação, mas na localização. No caso do *C. heterostrophus*, o rDNA está contido no nucléolo, enquanto no caso do *H. haematococca* o rDNA encontrava-se localizado no lado exterior do nucléolo. Nas outras fases do ciclo, destaca-se em ambos os casos uma condensação progressiva do rDNA, que tem início na interfase e princípio da profase, durante a qual o sinal é mais intenso indicando um estado mais condensado do que na interfase. Na metáfase os cromossomas encontram-se num elevado estado de condensação, mas a localização do rDNA apresenta diferenças na sua localização

em cada um dos organismos. No fungo *C. heterostrophus*, o sinal FISH encontra-se localizado como uma grande mancha no núcleo, ocupando uma grande porção do cromossoma. No caso do fungo do *H. haematococca*, o rDNA foi visualizado num estado altamente condensado, e constitui uma pequena porção do cromossoma deste organismo, localizado numa protuberância formada nesta fase do ciclo. A observação de protuberâncias similares ocorreu também noutros fungos filamentosos, como: *Botrytis* spp., *Alternaria alternata* e *Cochliobolus carbonum* (Shirane *et al.*, 1988, 1989; Taga & Murata, 1994; Tsuchiya & Taga, 2001) e ainda em leveduras como *Schizosaccharomyces pombe* (Umesono *et al.*, 1983; Uzawa & Yanagida, 1992).

Capítulo II: Material e métodos

Com o objectivo de estabelecer o cariótipo de *H. vastatrix* foram estudados dois isolados representando duas raças do fungo. Após otimizar o tempo e as condições de germinação e produção de apressórios para cada isolado, procedeu-se à cariotipagem citológica pelo método do rebentamento dos tubos germinativos, coloração do DNA e observação microscópica. Após optimização de protocolo de imobilização do material biológico em discos de agarose, com o objectivo de isolar cromossomas intactos, procedeu-se à cariotipagem electroforética utilizando a electroforese em gel de campo pulsado. Para a implementação do protocolo de hibridação *in situ* em *H. vastatrix* utilizaram-se sondas de rDNA clonadas em plasmídeo, marcadas com biotina e hibridadas ao material biológico fixado.

2.1 Material Biológico

2.1.1 Raças fisiológicas utilizadas

Neste trabalho foram usados uredósporos de duas raças fisiológicas de *H. vastatrix*, pertencentes à colecção existente no CIFC (tabela 2.1). Os uredósporos armazenados em cápsulas a -80 °C (Fig. 2.1) foram sujeitos imediatamente após a descongelação, a um choque térmico de 40 °C durante 10 min e seguidamente utilizados nos ensaios.

Tabela 2.1 - Isolados e raças fisiológicas de *Hemileia vastatrix* e respectivos hospedeiros e locais de origem (Bettencourt, 1981; Rodrigues *et al.*, 1975).

Isolado (Nº CIFC)	Raça	Hospedeiro	Origem
1065	II	<i>C. arabica</i>	Brasil
71	VI	<i>C. racemosa</i>	Moçambique



Fig. 2.1 - Conservação de uredósporos de *Hemileia vastatrix* em cápsulas de gelatina.

2.2 Germinação dos esporos de *H. vastatrix*

2.2.1 Obtenção de tubos germinativos

A germinação dos esporos foi realizada em caixas de Petri, onde se adicionaram 40 ml de água bidestilada estéril e uma pequena porção (30 - 50 mg) de esporos distribuídos de forma homogênea utilizando-se um pincel (Fig. 2.2A). A caixa de Petri foi fechada com parafilm® (Bemis) (Fig. 2.2B) e envolvida com papel de alumínio, para criar o ambiente escuro e húmido necessário à germinação do fungo (Fig.2.2C) e incubada a 25 °C durante 24 h.

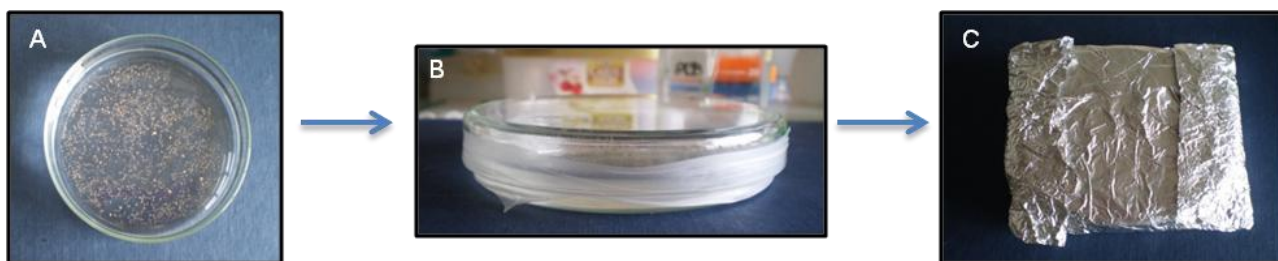


Fig. 2.2 - Germinação em água dos esporos de *Hemileia vastatrix*. **(A)** Esporos de *Hemileia vastatrix* na caixa de Petri; **(B)** Caixa de Petri fechada com parafilm; **(C)** Envolvimento da caixa de Petri com papel de alumínio.

2.2.2 Obtenção de apressórios

A base dos tabuleiros foi coberta com membranas de polipropileno (Fig. 2.3A), onde foram espalhados os esporos com o auxílio de um pincel (Fig.2.3B) e posteriormente aspergidos com água bidestilada estéril (Fig.2.3C). Seguidamente, os tabuleiros foram colocados dentro de um saco de plástico previamente molhado (Fig.2.3D) para criar um ambiente húmido, seguindo-se uma incubação a 25 °C, durante 24 h. Após a incubação os tubos germinativos e os apressórios formados foram reunidos com a ajuda de uma régua e recolhidos para um tubo de 1,5 ml.

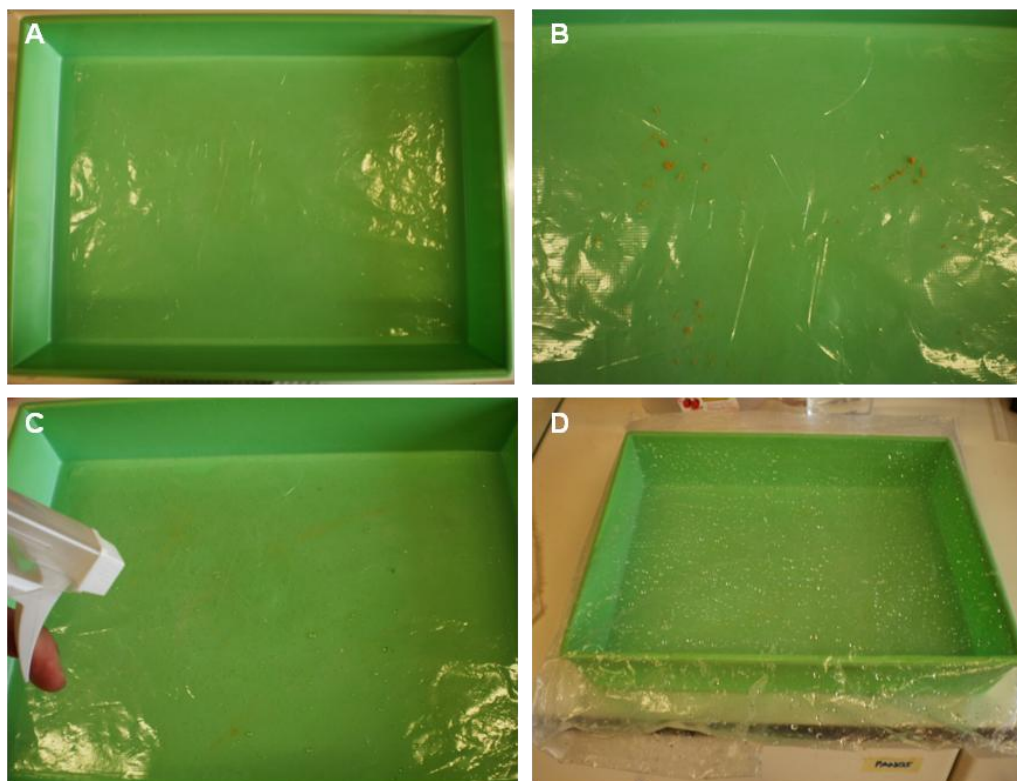


Fig. 2.3 - Esquema da germinação nas membranas de polipropileno dos esporos de *Hemileia vastatrix*. **(A)** Membranas na base do tabuleiro; **(B)** Esporos espalhados nas membranas; **(C)** Aspersão das membranas com água bidestilada estéril; **(D)** Tabuleiro no interior do saco de plástico.

2.3 Cariotipagem citológica

2.3.1 Tratamento das lâminas com poli-L-lisina

As lâminas de vidro (Deltalab) utilizadas na observação microscópica foram sujeitas a um tratamento prévio com poli-L-lisina, para promover a aderência do material biológico nas lâminas. A poli-L-lisina é um composto químico que apresenta cargas positivas promovendo a aderência às lâminas das moléculas de DNA que apresentam carga negativa (Mehrabi *et al.*, 2012). À superfície de cada lâmina, previamente lavadas com álcool a 70 %, foi aplicada poli-L-lisina diluída 1/10 com água bidestilada estéril. As lâminas foram expostas à poli-L-lisina durante 10 min à temperatura ambiente.

O excesso de poli-L-lisina foi retirado e as lâminas deixadas a secar durante a noite à temperatura ambiente.

2.3.2 Amostragem

A germinação dos uredósporos de *H. vastatrix* foi seguida entre as 12 h e 24 h após a inoculação nas membranas de polipropileno (12 h, 18 h, 20 h e 24 h). Em cada um dos tempos de recolha, foram registados o número de apressórios e de núcleos presentes no seu interior. A transição de dois para quatro núcleos no apressório, garante a ocorrência de uma divisão mitótica, o que aumenta a probabilidade de encontrar metáfases. Por este motivo, as amostras dos dois isolados foram recolhidas nos tempos de germinação que antecederam a observação de um grande número de apressórios com quatro núcleos. No isolado 71, as amostras foram recolhidas entre 17 h e 18 h após a inoculação de germinação, enquanto no isolado 1065 as amostras foram recolhidas entre 15h30 e 16h30. Para aumentar a probabilidade de visualizar cromossomas em metáfase foram recolhidas três amostras de 15 em 15 min, durante o intervalo de tempo apurado para cada isolado.

2.3.3 Agentes bloqueadores (tiabendazol)

O tiabendazol foi utilizado aquando da germinação de *H. vastatrix* nas membranas de polipropileno. Este composto químico foi utilizado para provocar uma pausa em metáfase na divisão mitótica, aumentando a probabilidade da observação de cromossomas individualizados. Este composto interfere com o transporte de aminoácidos durante a síntese proteica (Staron *et al.*, 1964) e na cadeia respiratória mitocondrial, evitando a redução do citocromo C (Allen & Gottlieb, 1970). Para testar a eficácia do tiabendazol foram utilizados dois tabuleiros: no primeiro foi adicionado tiabendazol na inoculação das membranas (30 ng/ml) e no segundo, o composto foi adicionado após 15 h de germinação (numa concentração de 60 ng/ml). Foram recolhidas amostras ao longo da germinação, espalhadas nas lâminas de vidro, lavadas com água bidestilada estéril e colocadas a secar à temperatura ambiente.

2.3.4 Método do rebentamento dos tubos germinativos

A técnica de GTBM foi aplicada com o objectivo de provocar o rebentamento dos tubos germinativos de *H. vastatrix* e consequente libertação do material nuclear. Os tubos germinativos foram espalhados com uma pipeta de ponta cortada em lâminas de vidro, que foram colocadas a secar à temperatura ambiente. Para provocar o rebentamento dos tubos germinativos, foram utilizadas duas proporções da mistura de metanol e ácido acético glacial: 22:3 (v/v) e 9:3 (v/v). Depois de secas, as lâminas foram colocadas no interior de uma tina de vidro e sujeitas à mistura de metanol e ácido acético glacial, durante 30 min e em seguida foram flamejadas para retirar os excessos desta mistura (Shirane *et al.*, 1988; Taga & Tsuchiya, 1994; Tsuchiya *et al.*, 2001).

2.3.5 Coloração do DNA

Para corar o DNA a cada lâmina foram adicionados 10 µl de DAPI (6- diamidino-2-fenilindol) (1 µg/ml), e colocada uma lamela de plástico em cada lâmina, durante 10 min. Após este período de tempo, as lamelas de plástico foram retiradas e as lâminas foram lavadas com 1 ml de água bidestilada estéril, para retirar o excesso de corante. Para evitar a dissipação da fluorescência durante a observação microscópica, foi adicionada a cada lâmina uma gota de um agente “anti-fading” (Vectashield - Vector Laboratories) e colocada uma lamela de vidro sobre cada preparação.

2.4 Cariotipagem electroforética – Electroforese em gel de campo pulsado

O primeiro passo na caracterização electroforética de *H. vastatrix*, consistiu em otimizar a produção de protoplastos, partindo dos tubos germinativos do fungo. Seguidamente, os protoplastos são imobilizados em discos de agarose e sujeitos à electroforese em gel de campo pulsado. Perante as dificuldades encontradas na obtenção de protoplastos, foi testada a imobilização de tubos germinativos nos discos de agarose. As condições de PFGE testadas foram iguais nos dois casos.

2.4.1 Preparação dos protoplastos

Para se obterem protoplastos a partir dos tubos germinativos de *H. vastatrix*, foi executado o protocolo descrito em 2009 por Eusebio-Cope e colaboradores com algumas modificações. Após a germinação na água, o conteúdo da caixa de Petri foi filtrado com duas camadas de nylon e lavado duas vezes com 0,6 M MgSO₄. As amostras foram ressuspensas em 5 ml de mistura enzimática, composta por 5 ml de 1,2 M MgSO₄ e 5 mg/ml de mistura enzimática (Lysing Enzymes from *Trichoderma harzianum*, Sigma) e incubadas durante 3 - 6 h, a 27 °C com agitação suave. Após a incubação foi feita uma filtração e foram adicionados 2 ml de tampão ST (em anexo). A recolha dos protoplastos foi feita após uma centrifugação a 750 g numa centrífuga Beckman Coulter Allegra X-12R, durante 5 min. Os protoplastos localizados na interface formada foram recolhidos e adicionados a 5 ml de tampão STC (em anexo), procedendo-se a nova centrifugação a 80 g, durante 5 min. Uma centrifugação adicional foi realizada a 750 g, durante 5 min, seguindo-se uma ressuspensão em 5 ml de tampão STC. Para finalizar, foi realizada uma nova centrifugação durante 5 min a 750 g e os protoplastos foram ressuspensos em 1 ml tampão CMP (em anexo) e guardados para posterior utilização a 4 °C.

2.4.2 Imobilização do material biológico

2.4.2.1 Protoplastos

A imobilização dos protoplastos foi realizada numa solução de low melting agarose (1,5 % w/v) (Bio-Rad) em tampão SE (em anexo). As amostras de protoplastos foram aquecidas no banho a 50 °C, às quais foram adicionados 1 ml de low melting agarose. Foram retiradas alíquotas de 30 µl desta mistura com vista à formação de discos de agarose, com recurso a uma montagem de lâminas de vidro. As lâminas formaram uma base onde foram colocadas as alíquotas que seguidamente foram cobertas por lâminas, deixando os discos para arrefecer e polimerizar. Para solidificarem mais rapidamente, os discos podiam ser colocados a 4 °C durante alguns minutos.

2.4.2.2 Tubos germinativos

Perante as dificuldades encontradas na obtenção de protoplastos, foi executado um protocolo que dispensa esta fase (McCluskey *et al.*, 1990). O primeiro passo consistiu em homogeneizar os tubos germinativos. Após uma filtração com nylon e uma lavagem com 2 ml de tampão STE (em anexo), os tubos germinativos foram transferidos para o homogeneizador (Pyrex tissue grinder), ao qual foram adicionados 3 ml do tampão STE. A suspensão foi homogeneizada e transferida para um tubo de 15 ml. De seguida, foram adicionados 7 ml de tampão STE ao homogeneizador (para remover vestígios de micélio) e transferidos para o tubo de 15 ml, que foi sujeito a uma centrifugação de 30 min a 3270 g, numa centrífuga Beckman Coulter Allegra X-12R. No final deste procedimento foi feita uma lavagem do precipitado com o tampão STE e uma nova centrifugação de 30 min a 3270 g. O micélio foi ressuscitado com 1 ml de tampão SE (em anexo) e colocado no banho a 50 °C. A imobilização do micélio foi feita de acordo com a secção 2.4.2.1. Após a imobilização, os discos foram incubados a 50 °C durante 48 h, numa solução de 45 mM EDTA, 1% SDS e proteinase K (1 mg/ml). No final do período de incubação, os discos de agarose, foram lavados com agitação três vezes com 0,5 M EDTA (pH 8,0). Os discos foram mantidos num tubo de 50 ml com EDTA (0,5 M e pH 8,0) e guardados a 4 °C.

2.4.3 Pulsed Field Gel Electrophoresis

Para obter a caracterização electroforética do fungo *H. vastatrix*, foi usado o aparelho CHEF-DR III System, da Bio-Rad (Fig.2.4).

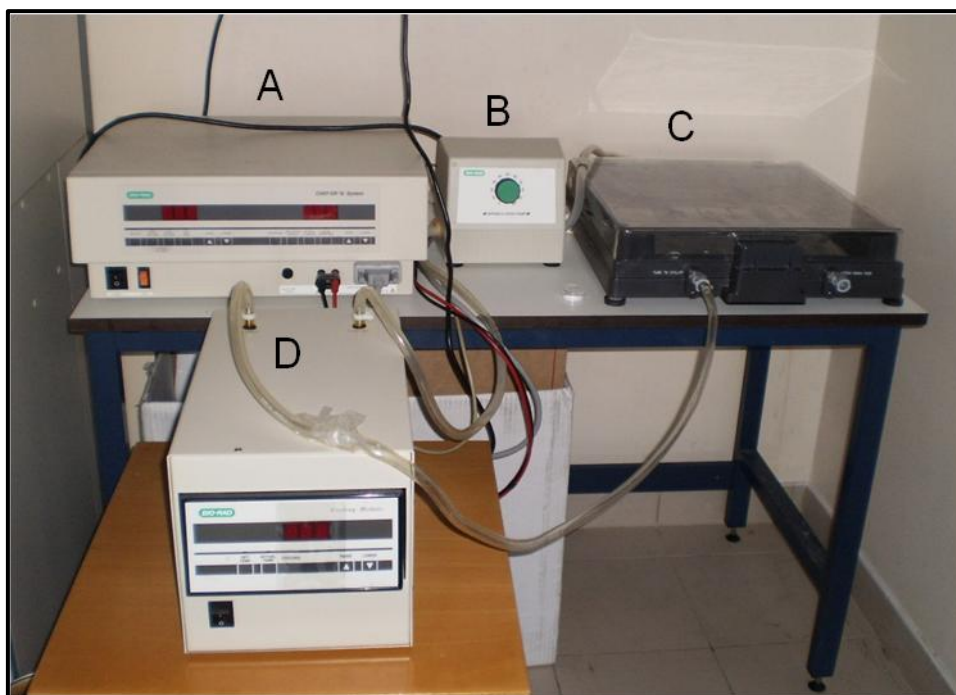


Fig. 2.4 - Equipamento do Counter-Clamped homogeneous electric field (CHEF). **(A)** Fonte de alimentação; **(B)** Bomba de circulação do tampão de electroforese; **(C)** Caixa do gel e controlador do campo eléctrico; **(D)** Refrigerador do tampão de electroforese.

Os discos de agarose com as amostras dos isolados 1065 e 71 de *H. vastatrix* foram colocados nos poços de um gel 0,8 % agarose (Sigma) em tampão TBE (0,5x) (Tris Boric Acid EDTA Buffer, Sigma), que foram selados com 1 ml de 1,5% de low-melting agarose (Sigma) em 0,5x TBE. Os cromossomas de *Saccharomyces cerevisiae*, estirpe YNN295 (Bio-Rad) foram utilizados como marcador.

Na realização da electroforese foram testadas duas condições diferentes:

1. **Condição 1:** tempo de pulso: 1800 - 4800 s; tempo de corrida: 72 h; campo eléctrico: 1,5 V/cm; ângulo de orientação: 106 °.
2. **Condição 2:** tempo de pulso: 120 - 150 s; tempo de corrida: 24 h; campo eléctrico: 3 V/cm; ângulo de orientação: 120 °.

Nas duas condições escolhidas, a temperatura do tampão foi de 14 °C.

No passo final, o gel foi corado numa solução de brometo de etídio (0,25 µg/ml) (Sigma) durante 2-3h e lavado com água desmineralizada, para retirar o excesso de brometo de etídio. O gel foi fotografado como o sistema Molecular Image Gel DocTM XR⁺ (Bio-Rad) e as imagens captadas com recurso ao programa Quantity One (versão 4.6.9- Basic).

2.5 Fluorescence *in situ* hybridization

2.5.1 Plasmídeos pABM1 e pABM2

Os plasmídeos pABM1 e pABM2 são constituídos por um fragmento de 2,8 e 2,4 Kb respectivamente. Estas sequências correspondem à região do 28 S, 5,8 S e metade da região 18 S de DNA ribossomal de *Alternaria alternata* (Tsuge *et al.*, 1989). Os plasmídeos apresentam resistência ao antibiótico ampicilina e foram gentilmente cedidos por Takashi Tsuge.

2.5.1.1 Preparação de células competentes de *Escherichia coli*

Para a obtenção de células que possam ser transformadas de modo a ser viável a introdução de DNA no seu interior, foi executado um protocolo utilizado no laboratório Plant Cell Biology (PCB – ITQB/UNL). O primeiro passo consistiu no crescimento de células de *E. coli* (XL – 2 Blue, Stratagene) em meio LB (Luria-Bertani) (em anexo), durante a noite, a 37 °C com agitação. Para tal foram adicionados 20 µl de suspensão celular, que se encontrava a - 80 °C, a um volume de 50 ml de meio LB. No dia seguinte foram retirados 3 ml da suspensão celular e adicionados a um frasco de 250 ml, com 50 ml de meio LB. Ocorreu nova incubação durante 2 h com agitação constante a 37 °C e foi feita uma centrifugação a 3020 g, durante 5 min a 4 °C, numa centrífuga Beckman J2-MI. O *pellet* foi ressuspenso em 50 ml de 0,1 M MgCl₂, frio e foi feita nova centrifugação a 3020 g, durante 5 min a 4 °C. Após esta centrifugação, o *pellet* foi ressuspenso em 25 ml de 0,1 M CaCl₂, frio e foi mantido no gelo durante 30 min. Para finalizar, foi feita uma nova centrifugação a 1940 g, durante 5 min e o *pellet* foi ressuspenso em 1,0 ml de CaCl₂ e mantido no gelo durante mais de 10 min.

2.5.1.2 Transformação de *E. coli*

Após a preparação das células no ponto anterior, e de acordo com o mesmo protocolo, foram retirados 100 µl da suspensão celular anterior para dois tubos de 1,5 ml e adicionado o DNA plasmídico (1,5 µg) supracitado no ponto 2.5.1. Os dois tubos de 1,5 ml foram mantidos no gelo durante 20 min e de seguida foram colocados a 42 °C, durante 45 s (choque térmico). As duas suspensões celulares foram colocadas no gelo durante 8 min e a cada uma foi adicionado 1 ml de meio LB. No passo seguinte, foi feita uma incubação a 37 °C durante 1 h - 1,5 h e no final deste período de tempo, foram plaqueados diferentes volumes de cada suspensão em caixas de Petri com meio LB e antibiótico (ampicilina, 0,1 mg/ml). O plaqueamento foi feito em 3 caixas de Petri para cada suspensão, com volumes diferentes em cada uma (100, 70 e 20 µl). As placas de Petri foram incubadas, durante a noite, a 37 °C na estufa.

2.5.2 Purificação do plasmídeo

2.5.2.1 Extracção

A extracção do plasmídeo partiu de uma colónia individualizada. Esta colónia foi colocada a incubar a 37 °C durante a noite, em 5 ml de meio LB e no dia seguinte, foi feita uma centrifugação a 3700 g, na centrífuga Beckman Coulter Allegra X-12R. Após a centrifugação, o DNA plasmídico foi extraído através do uso do QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), sem alterações ao protocolo.

A quantificação do DNA foi feita a 260 nm, revelando de acordo com o rácio Abs 260/280 um valor compreendido entre 1,7 - 1,9 e no caso da Abs 260/230, um valor superior a 1,9, indicativos do elevado grau de pureza do DNA.

2.5.3 Marcação das sondas

A marcação do DNA plasmídico, foi feita de acordo com o método de Biotin Nick Translation (Roche) (Fig.2.5). Num tubo para PCR foram adicionados 1 µg de DNA alvo, 4 µl de Biotin-Nick translation Mix (Roche) e o restante volume em água bidestilada estéril até perfazer o volume final de 20 µl. Seguiu-se uma centrifugação rápida e a incubação da reacção durante 90 min a 15 °C. A reacção de marcação da sonda foi parada através da adição de 1 µl de 0,5 M EDTA (pH 8.0) por cada 20 µl de reacção e aquecida durante 10 min a 65 °C.

Este método de marcação de DNA, permite a incorporação de deoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs) marcados (biotina-16-dUTP) e não marcados (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) em cadeias duplas de DNA. Neste processo são utilizadas duas enzimas: a DNase I e a DNA polimerase I. A enzima DNase I é uma endonuclease, responsável por criar cortes na cadeia dupla de DNA em locais adjacentes a nucleótidos de pirimidinas, mais precisamente na extremidade 3'OH. Seguidamente, a enzima DNA polimerase I, com actividade exonucleotídica, vai remover os nucleótidos adjacentes ao corte e sintetizar uma nova cadeia, adicionando nucleótidos e usando a extremidade 3'OH como primer, resultando na síntese de uma cadeia ao longo da cadeia de DNA molde.

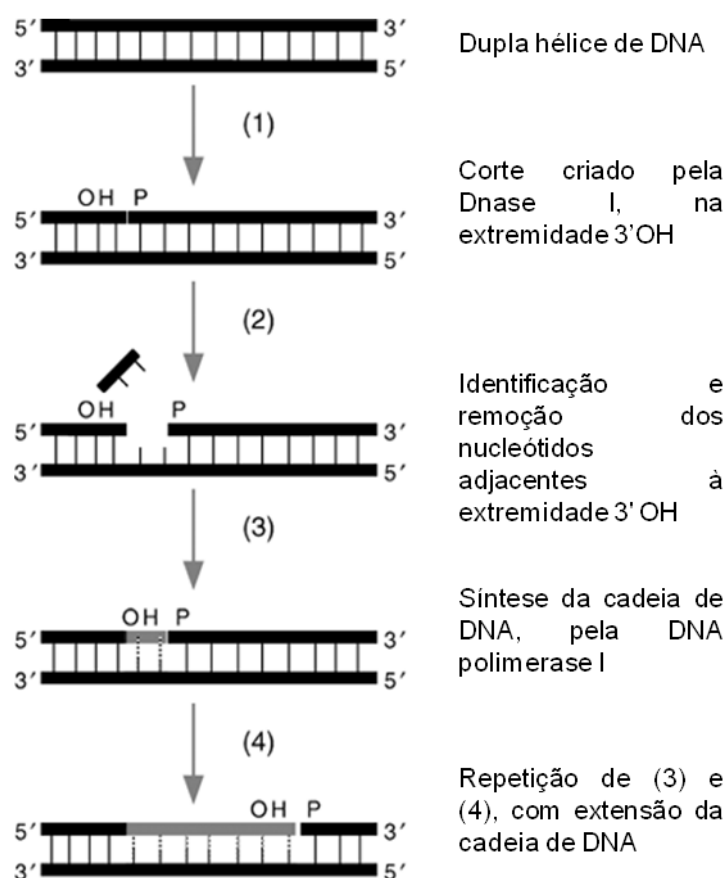


Fig. 2.5 - Marcação do DNA plasmídico, através da metodologia de Biotin Nick Translation (Roche).

2.5.4 Determinação do tamanho da sonda

Para determinar o tamanho do fragmento da sonda que deverá situar-se entre 200 - 500 nucleótidos, foi efectuada uma electroforese em gel de agarose a 0,8 % (contendo 1,25 µl de Green safe (Nzytech) por cada 100 ml de gel), na presença do marcador 1 Kb⁺ DNA Ladder (Invitrogen). Na electroforese foi utilizado 1 µl de DNA plasmídico e 3 µl por cada 20 µl de reacção de marcação da sonda obtida no ponto 2.5.3. A electroforese decorreu durante 30 - 40 min, a 70 V, 400 mA.

2.5.5 Confirmação da marcação da sonda por Dot-Blot

A técnica de Dot-Blot foi executada de acordo com o protocolo utilizado no laboratório Plant Cell Biology, com o objectivo de confirmar a marcação da sonda. No passo inicial foi utilizada uma membrana de nylon (Amersham), que foi embebida com o tampão nº1 (em anexo) durante 1 - 5 min, seca em papel de filtro e sobre a qual foram colocados 1 µl de sonda. Depois de seca, a membrana foi colocada de novo no tampão nº1 durante 1 min e depois no tampão nº2 (em anexo) durante 30 min com agitação. Após este intervalo de tempo, foi adicionada à membrana a solução de um anticorpo que se liga à biotina, o Anti-Bio-AP (Sigma) no tampão nº1 (1:500), e foi feita uma incubação a 37 °C durante 30 min. A membrana foi posteriormente lavada com o tampão nº1 durante 15 min e depois com o tampão nº3 (em anexo) durante 2 min. O passo final deste procedimento consistiu em preparar 1 ml de solução de detecção (0,45 % NTBP (4 - Nitro blue tetrazolium chloride); 0,35 % BCIP (5-bromo-4-chloro-2-indolyl-phosphate); 99,2 % tampão nº3) e posterior aplicação da mesma na membrana, durante 5 - 10 min. Esta mistura na presença da fosfatase alcalina do anticorpo Anti-Bio-AP vai produzir uma reacção corada na zona de aplicação da mistura. No final, a membrana foi lavada com água desmineralizada para remover resíduos da solução de detecção.

2.5.6 Purificação da sonda

A purificação da sonda foi o último passo a executar antes do protocolo FISH, para garantir a remoção dos nucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP e biotina-16-dUTP) que não se ligaram especificamente ao DNA plasmídico. A purificação foi feita através do QIAquick Nucleotide Purification Kit (50) (Qiagen), sem alterações ao protocolo, sendo eluída em 50 µl de água bidestilada estéril. A sonda foi armazenada a - 20 °C.

2.5.7 Protocolo FISH

O protocolo FISH foi executado de acordo com Castilho & Heslop-Harrison (1995). Anteriormente à hibridação foram executados tratamentos pré-hibridação, para evitar possíveis ligações inespecíficas.

2.5.7.1 Fixação do material

A fixação do micélio de *H. vastatrix* à lâmina de vidro foi feita com poli-L-lisina. Seguiu-se a aplicação de 50 µl de formaldeído 4 % MTSB (Microtubule Stabilizing Buffer) em cada lâmina, durante 30 min, para garantir a fixação do material celular. Seguiram-se duas lavagens de 5 min cada com o tampão de lavagem 2xSSC (Saline Sodium citrate) (na primeira lavagem as lamelas foram retiradas no interior da tina).

2.5.7.2 Tratamento com Pepsina e RNase

O tratamento com pepsina, foi feito através da adição da solução de pepsina a cada lâmina (6,74 µg/ml), durante 10 min em câmara húmida a 37 °C, para promover a digestão do citoplasma e da fracção proteica do DNA. Após esta incubação, para remover a pepsina foram feitas duas lavagens com o tampão de lavagem 2xSSC com agitação, durante 5 min, na primeira das quais as lamelas foram retiradas no interior da tina. Posteriormente, as lâminas foram sujeitas a um tratamento com RNase (100 µg/ml), no qual após a adição desta solução em cada lâmina foi feita uma incubação a 37 °C durante 1 h. Este passo teve como objectivo provocar a degradação do RNA, uma vez que se pretende uma hibridação DNA:DNA.

2.5.7.3 Lavagens pré-hibridação

As lâminas foram sujeitas a 3 lavagens de 5 min com 2xSSC com agitação (na primeira lavagem as lamelas foram retiradas no interior da tina) e nova fixação através da aplicação de 150 µl em cada lâmina de formaldeído 4 % MTSB, durante 10 min. De seguida, as lâminas foram sujeitas a 3 lavagens de 2xSSC com agitação, durante 5 min e desidratadas com álcool a 70 % e depois com álcool a 100 %, durante 3 min cada.

2.5.7.4 Hibridação

A mistura de hibridação foi preparada com diferentes reagentes de detecção, para garantir a hibridação da sonda com a sequência de DNA alvo. A formamida (50 % v/v) foi utilizada para destabilizar as moléculas de DNA favorecendo a sua desnaturação e evitar ligações inespecíficas. Na mistura de hibridação também foi utilizado o SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) (10 % w/v), para permeabilizar o material; o DNA de esperma de salmão (100 ng/ml), para impedir ligações inespecíficas da sonda; o sulfato de dextrano (50 %) para tornar a sonda mais viscosa, ajudando-a a ligar-se à cadeia de DNA complementar; a respectiva sonda (73,2 ng/µl), tampão 20xSSC (0,07 mol/µl) e água bidestilada estéril. Esta mistura foi sujeita a uma desnaturação a 80 °C durante 10 min e depois foi incubada no gelo durante 5 min, para evitar a renaturação. A cada lâmina foram adicionados 40 µl da mistura de hibridação e posterior incubação durante a noite, de acordo com o programa da tabela 2.2, realizado no termociclador (OMNISLIDE THERMO).

Tabela 2.2 - Programa executado no termociclador, para incubação das amostras sujeitas ao protocolo de Fluorescence *in situ* Hibridization (FISH) durante a noite.

Passo do programa	Tempo (min)	Temperatura (°C)
1	10	78
2	1	50
3	1,5	45
4	2	40
5	5	28
6	hold	37

2.5.7.5 Lavagens pós-hibridação

Após a incubação, foram feitas lavagens para remover o excesso de sonda ou a sonda que se ligou inespecificamente. As lâminas foram lavadas com 2xSSC, durante 3 min e com agitação a 42 °C. As lavagens seguintes foram feitas com formamida 20 % em 0,1x SSC, durante 10 min com agitação, a 42 °C e com 2xSSC, duas vezes durante 5 min com agitação a 42 °C. A última lavagem foi repetida com 2xSSC, à temperatura ambiente. Uma nova lavagem foi feita duas vezes com 50 ml de 4xSSC/Tween, durante 5 min, com agitação e à temperatura ambiente.

2.5.7.6 Detecção

Após as lavagens anteriores, foi aplicada a solução de BSA 5 % (Albumina de soro de bovino, Sigma) em 4xSSC/Tween durante 5 min, para ajudar a bloquear a ligação inespecífica do anticorpo, reduzindo o background. Seguiu-se a aplicação de 50 µl de solução de detecção (Streptavidin-Biotin-cy3 (Sigma) e BSA 5 % (1:100)) a cada lâmina, durante 1 h, a 37 °C, para detecção e visualização da sonda marcada com biotina. A última lavagem das lâminas foi feita com 4xSSC/Tween, três vezes durante 5 min, na primeira das quais as lamelas são retiradas no interior da tina. As lâminas foram coradas com DAPI (1 µg/ml) e montadas com um agente “anti-fading” (Vectashield – Vector Laboratories).

2.5.8 Microscopia óptica

Na observação microscópica do material biológico em estudo, foi utilizado um microscópio óptico de fluorescência (Leica DMRB, DFC 340FX). As lâminas coradas com DAPI foram observadas com lâmpadas de luz ultra violeta (excitação 340 - 380 nm, e filtro BP470/40) e as imagens foram captadas com recurso ao programa (Leica Application Suite, versão 3.3.0) e posteriormente tratadas

com recurso ao programa Adobe Photoshop CS5. Nas amostras em que foram identificados diferentes estados de condensação dos cromossomas, as imagens foram captadas com o microscópio óptico de fluorescência (Leica DM6000B) e com recurso ao programa Metamorph 7.6. Posteriormente foram sujeitas a desconvolução. A desconvolução é uma técnica de processamento de imagem baseada num método computacional, que remove a informação fora do foco de uma imagem com fluorescência (Paddock,1999). No final as imagens foram tratadas com o programa Adobe Photoshop CS5.

Na observação microscópica das amostras sujeitas ao procedimento FISH, as amostras foram observadas com lâmpadas de luz verde (excitação 545/30 nm; filtro 610/75) e as imagens foram captadas com recurso ao programa (Leica Application Suite, versão 3.3.0) e tratadas com recurso ao programa Adobe Photoshop CS5.

Capitulo III: Resultados e discussão

3.1 Cariótipo citológico de *H. vastatrix*

A aplicação da metodologia de GTBM à cariotipagem de um organismo baseia-se na observação microscópica de cromossomas metafásicos, considerando que nesta fase do ciclo mitótico os cromossomas apresentam-se em elevado estado de condensação sendo possível a sua individualização e consequente contabilização. Das observações recolhidas noutros fungos (por exemplo: Tsuchiya & Taga, 2001) tem sido evidente que o período de germinação dos esporos é determinante no número de metafases identificadas. Assim sendo, o estabelecimento do cariótipo citológico de *H. vastatrix* iniciou-se pelo acompanhamento dos tempos de germinação *in vitro* dos uredósporos, seguido da optimização da metodologia de GBTM e identificação das diferentes fases do ciclo mitótico.

A germinação em água dos uredósporos de *H. vastatrix* permitiu a formação de tubos germinativos (Fig. 3.1). Após a coloração do DNA nuclear com DAPI foi possível observar que os dois núcleos presentes nos esporos (Fig. 3.1A, B) migram para o tubo germinativo (Fig. 3.1C, D), tal como tinha sido observado anteriormente por Azinheira (2005) que usou uma técnica de coloração idêntica e por outros autores como Chinnappa & Sreenivasan (1965, 1967) e Rajendren (1967) que recorreram a metodologias diferentes de coloração, com uma solução alcoólica de HCl de carmina e ferro - hematoxilina respectivamente.

A germinação dos uredósporos em água foi seguida ao longo de 24 h e no interior dos esporos ou dos tubos germinativos apenas foram observados dois núcleos. No entanto os núcleos observados nos tubos germinativos apresentavam um aspecto distinto (Fig. 3.1E, F) quando comparado com o observado em núcleos facilmente identificáveis como a interfase, tendo em conta uma zona mais escura sem fluorescência normalmente associada com o nucléolo (Fig. 3.1A), sugerindo a entrada no ciclo mitótico. No entanto, perante a dificuldade na observação de cromossomas metafásicos de fungos (por ex: Tsuchiya & Taga, 2001), optou-se por outra abordagem que aumentasse a probabilidade de encontrar núcleos em metafase.

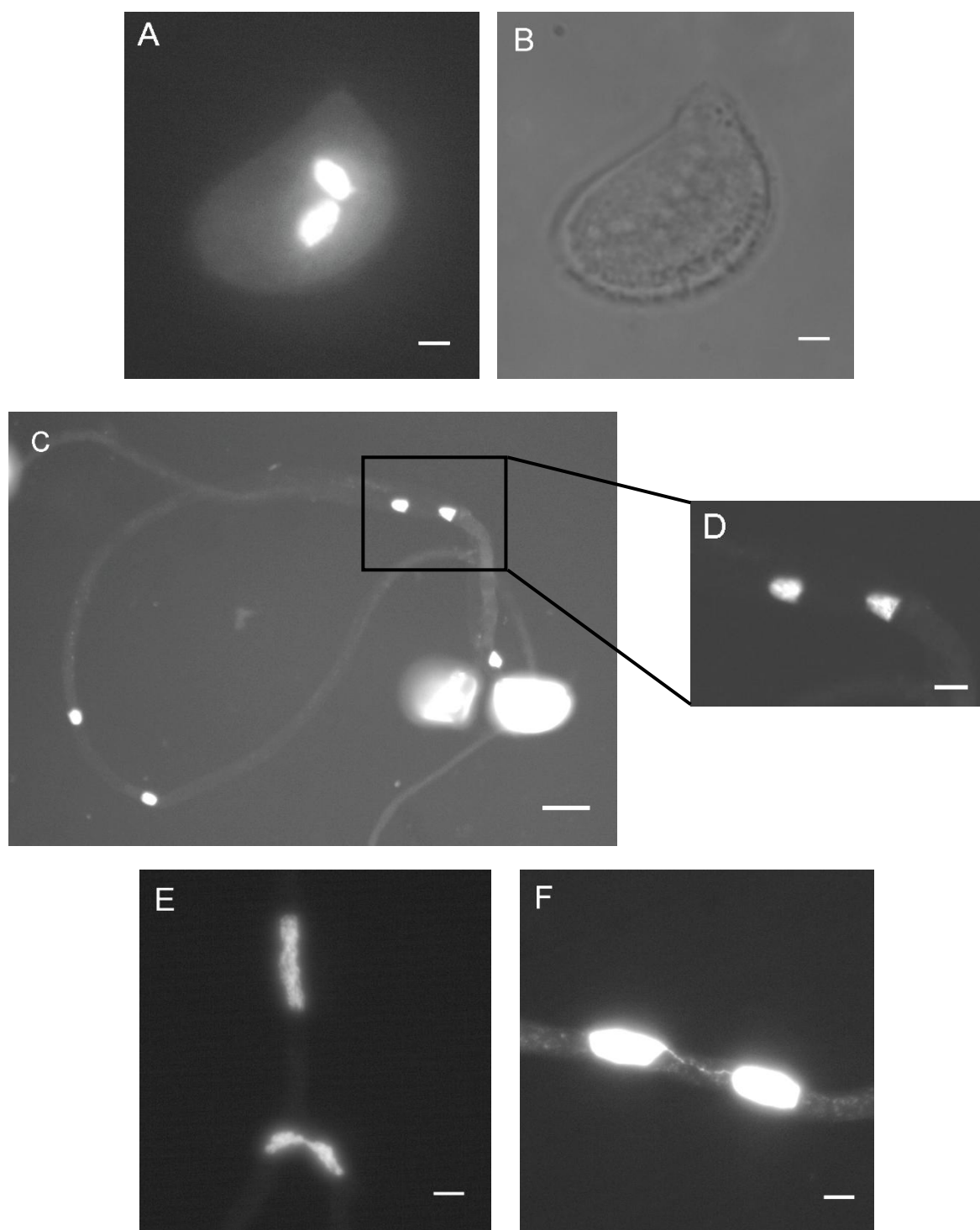


Fig. 3.1 - Núcleos observados em uredósporos e tubos germinativos de *Hemileia vastatrix* após germinação em água e coloração do DNA com DAPI. **(A)** Uredósporo com os dois núcleos no interior; **(B)** Uredósporo observado no visível; **(C)** Estruturas visualizadas após germinação dos uredósporos em água; **(D)** Pormenor dos núcleos interfásicos no interior dos tubos germinativos; **(E)** Núcleos alongados no interior do tubo germinativo; **(F)** Núcleos muito condensados e brilhantes no interior do tubo germinativo. Escala: 5 μ m (A, B, D, E, F); Escala 20 μ m (C). (A, B, E, F - isolado 1065; C, D - 71).

A germinação de uredósporos em membranas de colódio permite a formação de tubos germinativos e apressórios. Os esporos deste fungo fitopatogénico e de outros fungos necessitam de sinais físicos existentes na superfície da folha, para germinarem e formarem a estrutura de infecção, o apressório (Podila *et al.*, 1993). Esta estrutura é formada a partir da expansão do tubo germinativo (Fig. 3.2), do qual migram o citoplasma e os núcleos. O apressório é separado do tubo germinativo através da formação de um septo (Fig. 3.3A - assinalado com a seta preta). Azinheira (2005) testou diversos tipos de membranas, colódio, folhas de gelatina alimentar, celulose, nitrocelulose e polietileno, com o objectivo de produzir *in vitro* estruturas de infecção, e concluiu que as membranas de colódio apresentaram os melhores resultados e mostraram-se bastante eficientes na germinação dos uredósporos e diferenciação de apressórios. No apressório foi ainda identificada uma estrutura designada de apêndice (Fig. 3.3A, C, E - assinalado com a seta vermelha), que na planta iria originar a hifa de penetração, responsável pelo processo de infecção no interior do tecido vegetal (Azinheira, 2005). Estudos recentes sugeriram que a germinação e formação de apressórios em membranas de polipropileno alcançam taxas comparáveis com as verificadas nas membranas de colódio (H.G. Azinheira, comunicação pessoal).

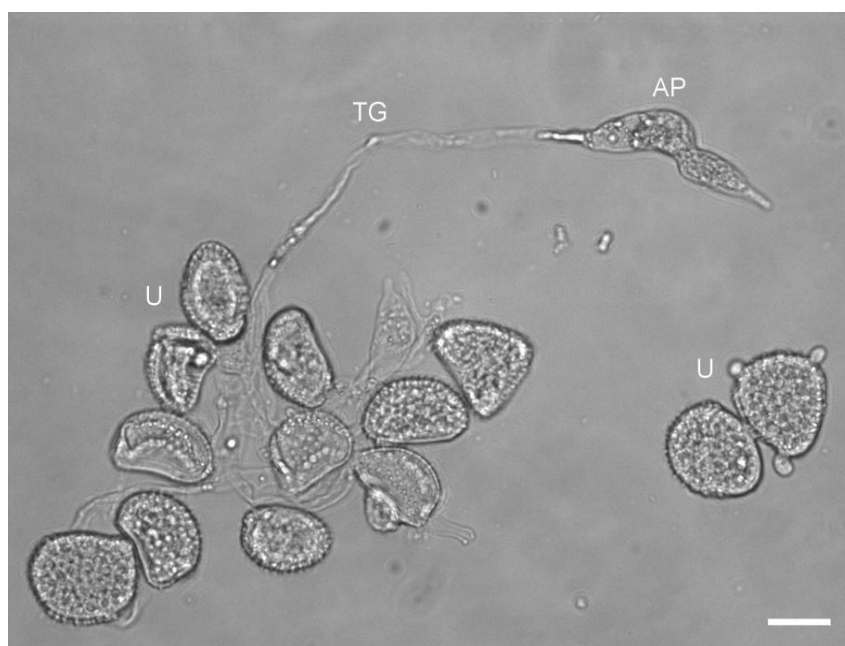


Fig. 3.2 - Identificação das diferentes estruturas formadas, durante a germinação *in vitro*, em membranas de polipropileno artificiais do isolado 1065 de *Hemileia vastatrix*. Legenda: U - uredósporo; TG - tubo germinativo; Ap - apressório. Escala: 20 µm. Imagem de Microscopia do Visível.

Os apressórios resultantes da germinação dos uredósporos em membranas de polipropileno apresentavam no seu interior dois (Fig. 3.3G), três ou quatro (Fig. 3.3B, D, F, H) núcleos sendo, que na maioria se observaram quatro núcleos (Azinheira, 2005; Rajendren, 1967), indicando que entre a germinação dos esporos, diferenciação dos tubos germinativos e apressórios ocorreu necessariamente a mitose em cada um dos núcleos provenientes dos uredósporos. Nas observações

efectuadas foi também visível uma ligação entre dois núcleos (Fig. 3.3H), que poderá indicar a fase final da citocinese.

Com base nas informações e observações descritas anteriormente para *H. vastatrix* recolheram-se amostras ao longo da germinação dos uredósporos em membranas de polipropileno no período de tempo que antecede o aparecimento dos quatro núcleos no apressório, considerando que assim a probabilidade de encontrar núcleos em metafase é maior. Nos dois isolados de *H. vastatrix* estudados, o tempo de recolha de amostras de germinação foi ligeiramente distinto. Para o isolado 71, após 12 h de germinação foram apenas observados tubos germinativos. Entre as 12h e as 18 h de germinação foram observados alguns apressórios com dois, três e quatro núcleos no seu interior. Após as 18 h o número de apressórios aumentou consideravelmente, o que determinou a recolha de amostras em tempos de germinação anteriores às 18 h. Desta forma, as amostras deste isolado foram recolhidas nos tempos compreendidos entre as 17 h e 18 h de germinação. No caso do isolado 1065, o aparecimento de apressórios com quatro núcleos ocorreu em tempos de germinação mais curtos que no isolado anterior, estabelecendo-se a recolha de amostras para este isolado entre as 15h30 e 16h30 de germinação.

Após escolha do período de recolha das amostras passou-se à fase seguinte fundamental para a obtenção do cariótipo de *H. vastatrix*: a optimização da técnica de GTBM responsável pelo rebentamento dos tubos germinativos e pela libertação dos núcleos.

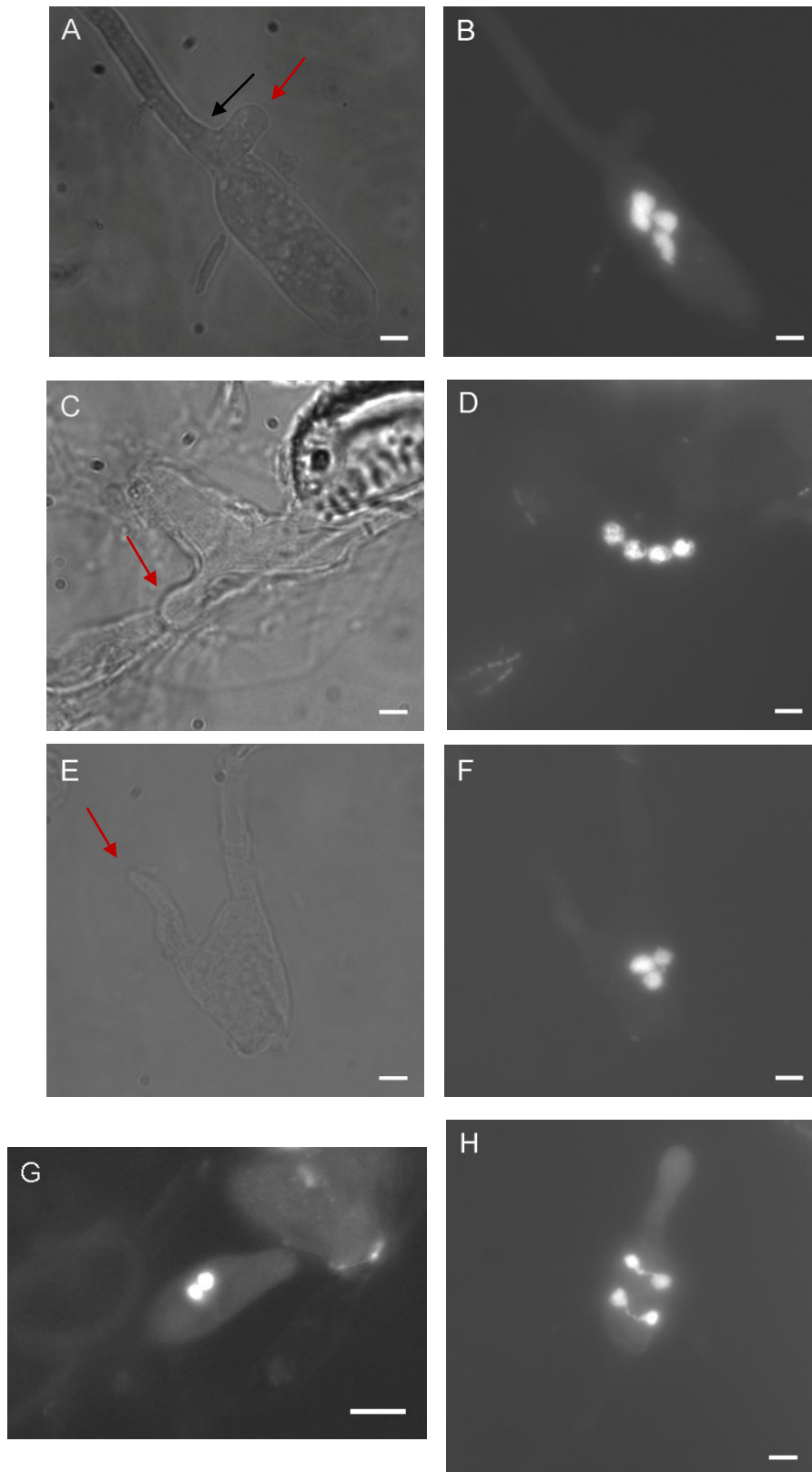


Fig. 3.3 - Apressórios de *Hemileia vastatrix* com dois e quatro núcleos no interior, após coloração do DNA nuclear com DAPI. **(A)**, **(C)** e **(E)** Apressórios com quatro núcleos no interior (visível); **(B)**, **(D)**, **(F)**, **(G)** e **(H)** Apressórios com dois e quatro núcleos no interior (UV). Escala: 5 μm (A, B, C, D, E, F, H); Escala 20 μm (G). Isolado 1065. (seta vermelha assinala o apêndice; seta preta assinala o septo).

3.1.1 Otimização do GTBM

A técnica de GTBM foi otimizada com o objectivo de provocar o rebentamento dos tubos germinativos e a fixação dos cromossomas à lâmina, sem que haja uma degradação do material nuclear. Foram testados dois parâmetros essenciais: a proporção da mistura de metanol e ácido acético glacial nas razões 22:3 e 9:1 e o tempo de exposição às mesmas. As proporções 22:3 e 9:1 juntamente com a 17:3, são as mais utilizadas por outros autores (nomeadamente Tsuchiya & Taga, 2001; Taga *et al.*, 1998; Taga *et al.*, 2003; Taga & Murata, 1994) em estudos sobre o cariótipo de fungos. Este é o parâmetro central nesta técnica e varia bastante com a espécie, sendo sempre necessária a sua optimização. As amostras foram sujeitas a cada uma das proporções durante 10 min, no entanto, após este tempo de exposição foram observados um número reduzido de tubos germinativos rebentados e, por este motivo, foram testados outros tempos de exposição: 15, 20, 25 e 30 min. Ao comparar tempos iguais de exposição com as duas proporções diferentes foi visível um maior estado de degradação do material nuclear na proporção de 9:1, comparativamente com a de 22:3, onde os núcleos libertos dos tubos germinativos se apresentavam intactos e com um estado de degradação menor. Inicialmente utilizou-se rotineiramente um tempo de exposição de 15 min, contudo observou-se em muitas preparações um número razoável de tubos não rebentados ou com pequenas quebras (Fig. 3.4A, B) que não permitiam a libertação completa, individualização e espalhamento dos cromossomas na lâmina. Assim, testou-se um aumento do tempo de exposição para o dobro, 30 min, tornando-se o GTBM mais eficiente no rebentamento dos tubos germinativos e sem um aparente aumento da degradação do material nuclear (Fig. 3.5). A aplicação do GTBM é assim um balanço entre a eficiência do rebentamento dos tubos e minimização da degradação provocada.

As condições optimizadas da técnica de GTBM aplicada aos tubos germinativos de *H. vastatrix* foram: proporção de 22:3 de metanol e ácido glacial utilizada num tempo de exposição de 30 min.

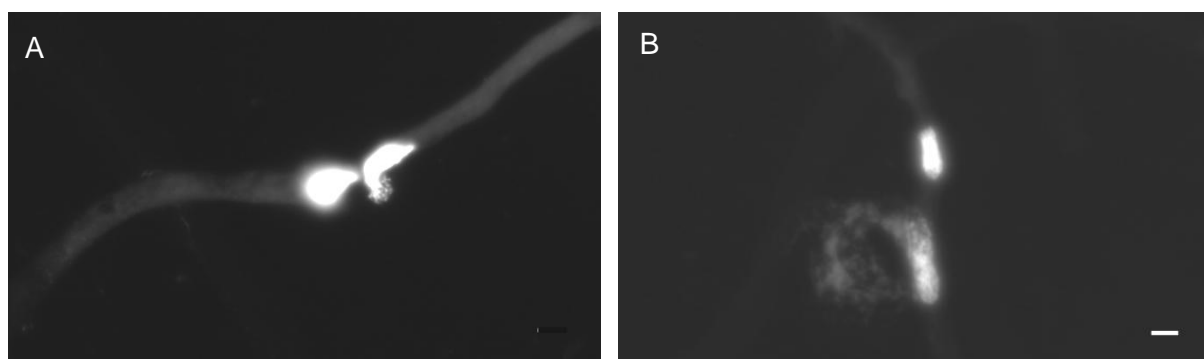


Fig. 3.4 - Quebra incompleta dos tubos germinativos do isolado 71 de *Hemileia vastatrix*, com libertação parcial do material nuclear para a lâmina após a aplicação do método do rebentamento dos tubos germinativos e coloração do DNA nuclear com DAPI. Escala: 5 μ m.

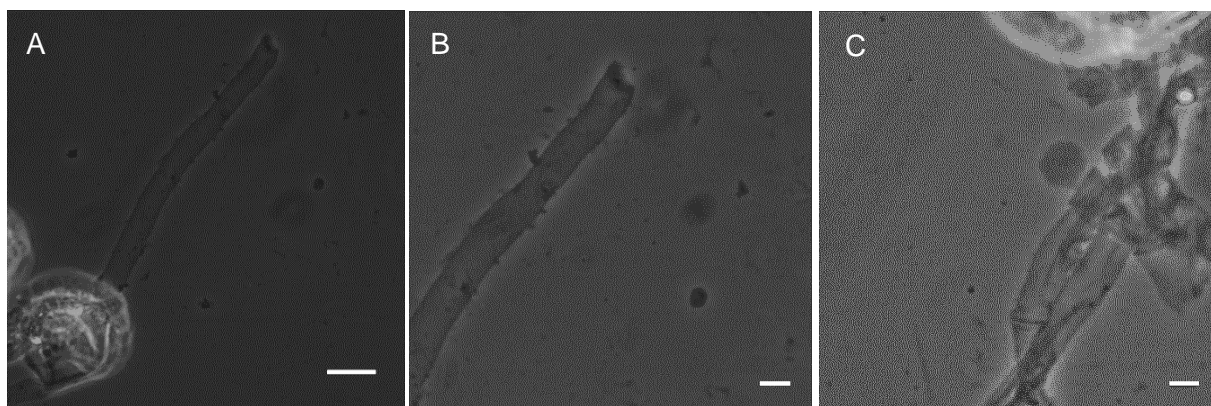


Fig. 3.5 - Rebentamento do tubo germinativo para o isolado 1065 de *Hemileia vastatrix*. **(A)** Tubo germinativo rebentado; **(B)** Pormenor do tubo germinativo rebentado; **(C)** Rebentamento do tubo germinativo e libertação do núcleo do seu interior. Escala: 20 µm (A); Escala: 5 µm (B, C). Imagens de Microscopia de Contraste de Fase.

3.1.2 Identificação das fases do ciclo mitótico

A identificação das fases do ciclo mitótico foi realizada com base na bibliografia publicada sobre fungos, nomeadamente por Beattie (2006) e Taga e colaboradores (2003). A coloração com DAPI mostrou-se eficaz e com elevada fluorescência ao nível do DNA nuclear que, com a adição do anti-fading tornou-se estável, e permitiu minuciosas observações ao microscópio. Apesar do elevado background provocado pela fluorescência dos esporos, pelas espículas dos mesmos e pela parede celular dos tubos germinativos, o DNA nuclear foi facilmente identificável.

Contudo, o número de núcleos em metafase foi insuficiente ao usualmente necessário para caracterizar o cariótipo de um organismo e, por isso, testou-se um composto químico responsável pela paragem do ciclo celular na metafase. O tiabendazol é responsável por inibir crescimento dos tubos germinativos, sendo rapidamente absorvido pelos esporos e distribuído em pequenas quantidades pelos organelos celulares (Allen & Gottlieb, 1967; Tsuchiya & Taga, 2001). Os resultados da aplicação do tiabendazol nas amostras de *H. vastatrix* foram negativos. Este composto químico inibiu a germinação do fungo quando aplicada em baixa concentração ao início da germinação e não foi observado um aumento do número de núcleos metafásicos nas preparações resultantes da aplicação em concentração superior após 15 h de germinação. Tsuchiya e Taga (2001) tinham observado anteriormente a ineficácia deste composto no aumento da frequência metafásica para os fungos *C. heterostrophus*, *C. carbonum* e *C. sativus*. Em 2004, Tsuchiya e colaboradores demonstraram a eficácia deste composto na paragem do ciclo celular em metafase para o fungo *N. crassa*.

Perante estes resultados, insistiu-se na recolha das amostras, aumentando o número de - amostras durante o período anteriormente identificado, sem a aplicação de agentes bloqueadores da divisão celular, apesar de no processo de germinação dos esporos, ter sido observado um desenvolvimento assíncrono na diferenciação das estruturas do fungo e na divisão mitótica dos núcleos.

Os núcleos em prófase (Fig. 3.6B) observados nas amostras de *H. vastatrix*, caracterizaram-se por serem alongados e brilhantes, devido à agregação da cromatina, da qual resulta uma intensa fluorescência, tal como foi registado por Taga e colaboradores (2003) para o fungo *H. haematococca*. As características apresentadas por estes núcleos são indicativas de um aumento do estado de condensação do DNA, que atinge o seu máximo na próxima fase do ciclo. A identificação de cromossomas em metafase foi feita para o isolado 71 (Fig. 3.6C), sendo possível observar diferentes estados de condensação dos cromossomas. Nesta fase do ciclo, podemos destacar a formação de uma protuberância observada para o isolado 1065 (Fig.3.1F), que foi identificada por Taga e colaboradores (2003) em núcleos metafásicos. Em 2006, Beattie identificou esta estrutura em núcleos metafásicos de *Pyrenophora teres* como a região NOR (Regiões do Organizador Nucleolar). A visualização de anáfases foi muito rara, no entanto foi identificada uma passagem do ciclo celular que através da comparação com o estudo de Taga e colaboradores (2003), poderá indicar o fim da anáfase e princípio da telófase (Fig. 3.6D), uma vez que foram observados um par de pequenos núcleos muito brilhantes e condensados. A observação microscópica realizada nas amostras de *H. vastatrix* permitiu ainda visualizar um elevado número de núcleos interfásicos (Fig. 3.6A), que apresentavam regiões muito brilhantes, possivelmente zonas ricas nos nucleótidos adenosina (A) e tirosina (T), considerando a ligação preferencial do DAPI às regiões AT do DNA (Mehrabi *et al.*, 2007). Nos núcleos interfásicos foi possível identificar a região nucleolar, que apresenta uma menor fluorescência quando corada com DAPI.

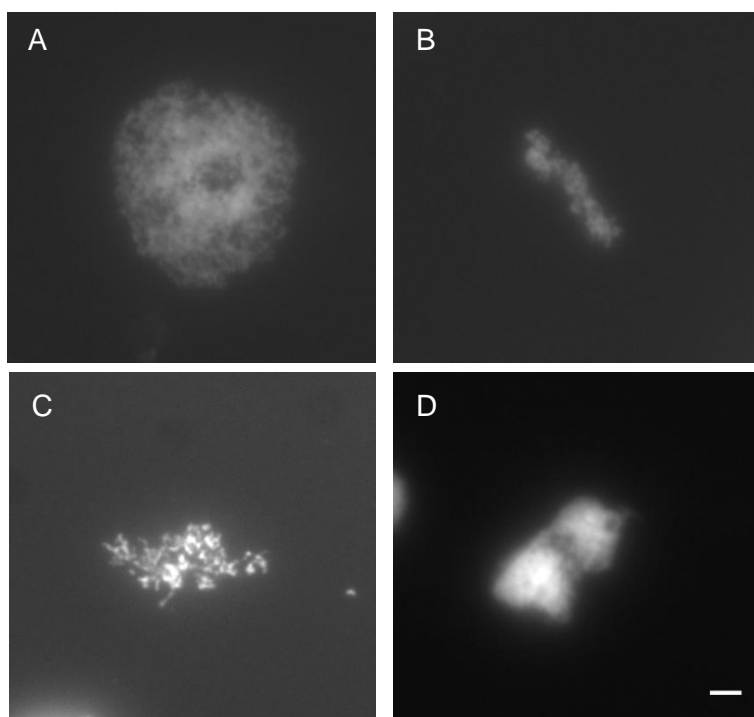


Fig. 3.6 - Identificação das diferentes fases do ciclo celular para *Hemileia vastatrix*, após a aplicação do método do rebentamento dos tubos germinativos e coloração do DNA nuclear com DAPI. **(A)** Núcleo interfásico; **(B)** Núcleo provavelmente em prófase; **(C)** Núcleo provavelmente no início de uma metafase; **(D)** Núcleo no final da anáfase, princípio da telófase. Escala: 5 μ m. (A, C – isolado 71; B, D – Isolado 1065).

3.1.3 Análise das figuras metafásicas

Na identificação dos cromossomas em metafase, foram observados diferentes níveis de condensação. Na Fig. 3.7 são apresentados os cromossomas observados para o isolado 71, tendo sido estimado um número mínimo de sete cromossomas e máximo de 14. As diferenças na contagem do número de cromossomas, advêm da técnica de GTBM e foi registada por outros autores em estudos idênticos de cariotipagem. Na determinação dos cromossomas de *C. heterostrophus* e *C. sativus* (Tsuchiya e Taga, 2001), *M. graminicola* (Mehrabi *et al.*, 2007) e *N. haematococca* (Taga *et al.*, 1998), as diferenças observadas nas contagens destes organismos, foram atribuídas por estes autores ao método citológico. Por este motivo, o número estimado de cromossomas para cada organismo é relativo ao número máximo de cromossomas observados. Nas observações feitas em *H. vastatrix*, não foi observado um número significativo de metafases, para ser feito um estudo semelhante, por isso, é feito apenas uma estimativa do número de cromossomas do isolado 71, partindo do número mínimo e máximo de cromossomas observados. Contudo, o número máximo de cromossomas estimado para o isolado 71 é coincidente com a contagem realizada em 1965 por Chinnappa & Sreenivasan. Estes autores estimaram um número de 14 cromossomas, partindo da observação de teleutósporos germinados *in situ*. O método utilizado foi um método de citologia tradicional, onde as amostras eram coradas com uma solução alcoólica de HCl de carmina. Segundo estes autores, a dificuldade na observação dos cromossomas é consistente com as dificuldades encontradas nesta tese, uma vez que a estimativa apresentada por Chinnappa & Sreenivasan (1965), reporta à imagem mais nítida, observada durante a germinação dos teleutósporos.

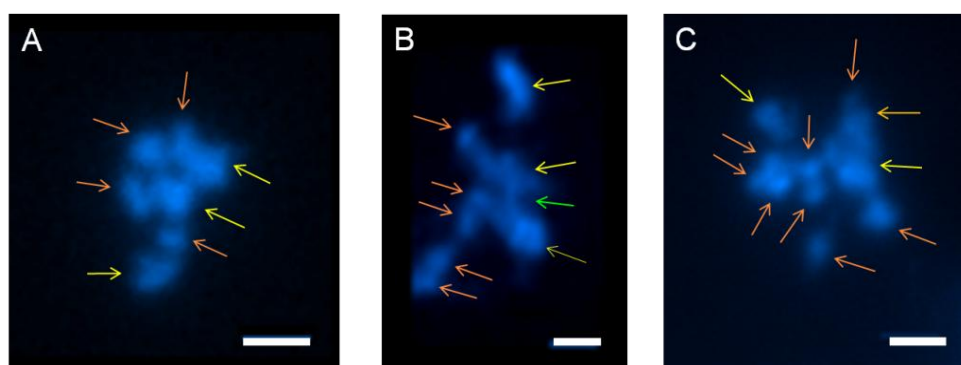


Fig. 3.7 - Identificação de diferentes níveis de condensação de cromossomas metafásicos, do isolado 71 de *Hemileia vastatrix*, após a aplicação do método do rebentamento dos tubos germinativos e coloração do DNA com DAPI. **(A)** Identificação de um número mínimo de sete cromossomas e máximo de 10. As setas laranja identificam um cromossoma cada e as setas amarelas podem indicar dois cromossomas cada, considerando uma maior intensidade de fluorescência; **(B)** Identificação de cinco cromossomas (setas laranja) e de quatro cromossomas (setas amarelas, dois em cada seta). As setas verdes poderão indicar um outro cromossoma. Neste caso, foi estimado um número mínimo de oito cromossomas e máximo de 12; **(C)** Identificação de oito cromossomas (setas laranja) e de seis cromossomas (setas amarelas), estimando-se um número mínimo de 11 cromossomas e máximo de 14 cromossomas. Escala: 1 μ m.

3.2 Caracterização electroforética

A determinação do cariótipo electroforético de *H. vastatrix*, iniciou-se com a optimização do protocolo de obtenção de protoplastos, para garantir a obtenção de DNA cromossómico intacto. Perante as dificuldades na obtenção de um número suficiente de protoplastos, foi testado outro protocolo que eliminava este passo, permitindo a obtenção de DNA cromossómico a partir dos tubos germinativos do fungo. Seguidamente, o material biológico foi imobilizado em discos de agarose e sujeito a diferentes condições de PFGE, de forma a separar cromossomas com diferentes tamanhos moleculares.

3.2.1 Obtenção de protoplastos

Na Fig. 3.8 são apresentados os resultados da obtenção de protoplastos com a mistura enzimática lysing enzymes from *Trichoderma harzianum* (Sigma). A observação microscópica com luz visível mostrou que os protoplastos se encontravam individualizados (Fig. 3.8A) ou em agregados (Fig. 3.8B, C e D). Contudo, o número de protoplastos formados foi insuficiente, não atingido a concentração necessária para a realização de PFGE, que está reportada em 10^8 protoplastos/ml (Tsuchiya & Taga, 2001).

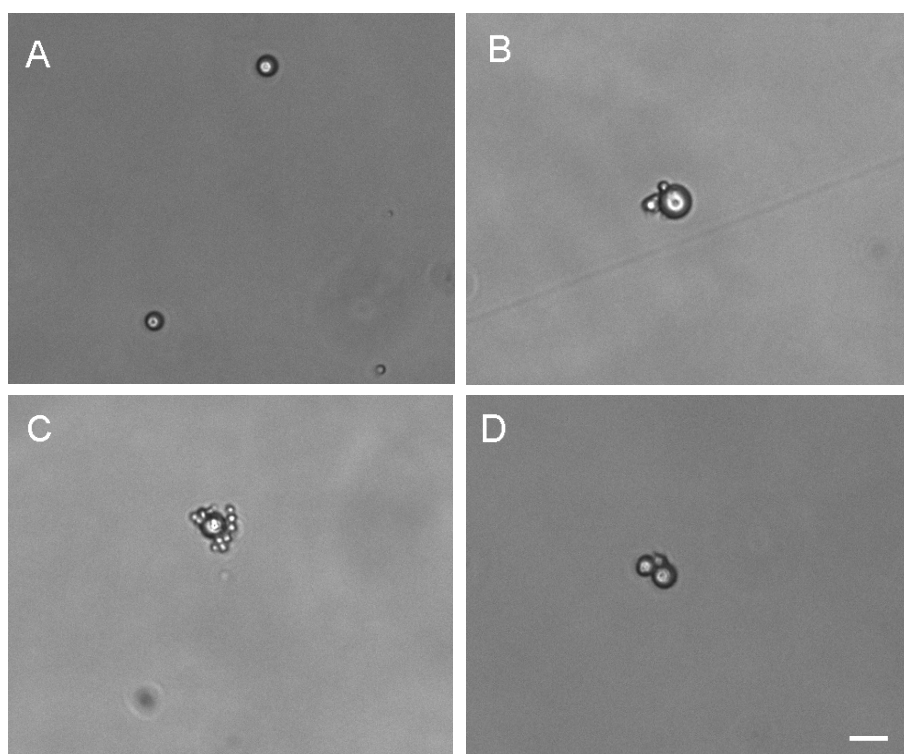


Fig. 3.8 - Observação de protoplastos do isolado 1065 de *Hemileia vastatrix*. Os protoplastos podiam ser observados individualmente (**A**) ou em agregados (**B**, **C** e **D**). Escala: 5 μ m. Imagem de Microscopia do Visível.

A produção de protoplastos foi descrita pela primeira vez no fungo filamentoso *N. crassa* (Bachmann & Bonner, 1959; Emerson & Emerson, 1958) e desde então, tem sido amplamente utilizada em inúmeros fungos (Eusebio-Cope *et al.*, 2009; Marchi *et al.*, 2006; Taga *et al.*, 1998; Tsuchiya & Taga, 2001). A formação de protoplastos depende de vários factores, como o tipo e concentração de mistura enzimática utilizada, o tempo de digestão, o estabilizador osmótico, o pH e a temperatura da incubação (Marchi *et al.*, 2006). As diferenças na composição e arquitectura da parede celular dos fungos influencia a produção de protoplastos, uma vez que são obtidos resultados distintos na digestão da mesma, quando aplicados diferentes complexos enzimáticos. Gander (1974) observou diferenças na digestão da parede celular de duas espécies distintas de fungos, apesar do mesmo complexo enzimático ter sido utilizado.

Chang e colaboradores (1985) confirmaram as diferenças na degradação da parede celular de espécies diferentes de fungos, ao testarem várias misturas enzimáticas, das quais se destaca a Novozym 234 (proveniente da enzima *T. harzianum*) e a Lywallzyme (proveniente da enzima *T. longibrachiatum*) na degradação da parede celular de fungos como: *Agarius bisporus* e *Volvariella volvacea*.

Em 2006, Marchi e colaboradores demonstraram que a concentração da mistura enzimática e o tempo de incubação também influenciam a produção de protoplastos. No trabalho desenvolvido por estes investigadores, foi comprovado que ao utilizar misturas enzimáticas em conjunto e ao aumentar a concentração da mistura enzimática, regra geral, a produção de protoplastos sofria um aumento. O tempo de incubação do material biológico com a mistura enzimática também foi testado por estes investigadores, que puderam observar que após 5 h de incubação ocorria uma diminuição do número de protoplastos observados, provavelmente devido à degeneração dos primeiros protoplastos formados (Kim *et al.*, 2000). No caso de *H. vastatrix*, observámos que o aumento do tempo de incubação para 24 h com a mistura enzimática utilizada, não provocou um aumento do número de protoplastos.

Por último, a dificuldade na obtenção de protoplastos pode estar relacionada com o facto de existirem espécies, a partir das quais é difícil produzir protoplastos partindo de tubos germinativos. A solução para este problema poderia passar por duas alternativas: utilizar esporos ou micélio produzidos pelo fungo (Mehrabi *et al.*, 2012). No entanto, devido à composição da parede celular dos esporos de *H. vastatrix* (Fig. 3.1B), extremamente resistente à degradação enzimática, o processo de formação de protoplastos seria bastante difícil. Considerando que não é possível obter micélio *in vitro* de *H. vastatrix*, uma vez que se trata de um parasita obrigatório que só sobrevive em contacto directo com o cafeeiro, a segunda opção também não é realizável. Perante os resultados obtidos na produção de protoplastos, testou-se um protocolo que evita a sua formação e baseia-se na imobilização de tubos germinativos nos discos de agarose, ocorrendo a degradação da parede e membrana celular no interior dos discos.

3.2.2 Electroforese em gel de campo pulsado

As dificuldades na separação de cromossomas de tamanhos muito diferentes, numa só experiência foram evidenciadas pela pesquisa bibliográfica efectuada e, por este motivo, estabeleceram-se dois conjuntos de condições que permitiram separar cromossomas com baixo/médio tamanho molecular (Fig. 3.9) e de elevado tamanho molecular (Fig. 3.10) (dentro do alcance dos cromossomas de *S. cerevisiae*), após a imobilização do material biológico em discos de agarose.

As amostras relativas aos esporos de *H. vastatrix* imobilizados nos discos de agarose não apresentaram sinal, uma vez que a parede celular dos esporos apresenta uma estrutura muito difícil de degradar, o que muito provavelmente dificultou a libertação do DNA nos discos de agarose (Fig. 3.9 - 2, 3, 4, 7, 8; Fig. 3.10 - 2, 3). Nos discos de agarose onde se imobilizaram tubos germinativos foi possível observar sinal após electroforese, possivelmente por uma maior facilidade na degradação da parede celular dos tubos germinativos (Fig. 3.9 - 9, 10, 11, 12, 13, 14; Fig. 3.10 - 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14). Constatou-se ainda que os protoplastos não apresentaram sinal nas duas condições testadas de electroforese (Fig. 3.9 - 5, 6; Fig. 3.10 - 6, 7), confirmando a baixa concentração de protoplastos anteriormente reportada.

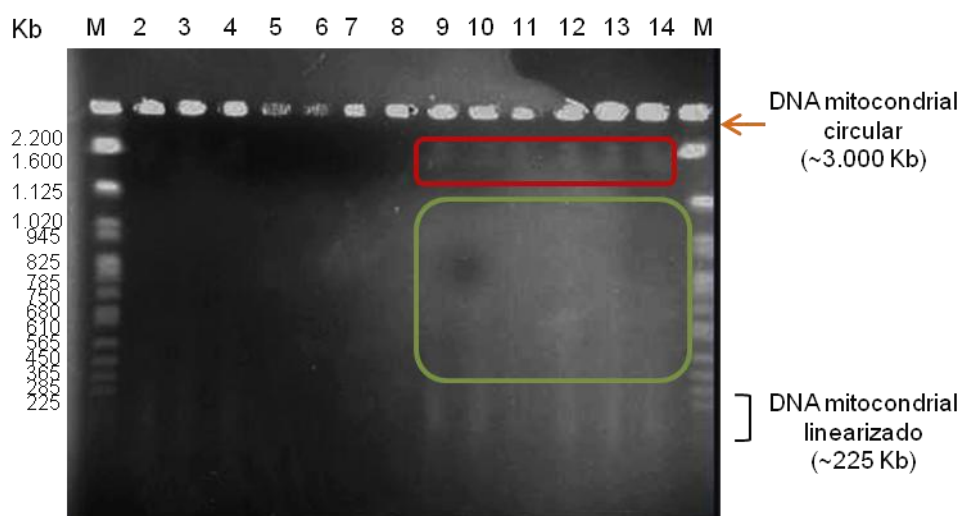


Fig. 3.9 - Electroforese em gel de campo pulsado para a separação de cromossomas de baixo/médio tamanho molecular de *Hemileia vastatrix*. Condições testadas: tempo de pulso: 120 – 150 s; tempo de corrida: 24 h; campo eléctrico: 3 V/cm; ângulo de orientação: 120 °. M – marcador molecular (*Saccharomyces cerevisiae* (YNN285)); Esporos do isolado 1065 (5/8/11) (2, 3 e 4); Protoplastos do isolado 71 (5/8/11) (5 e 6); Esporos do isolado 71 (5/8/11) (7 e 8); Tubos germinativos do isolado 1065 (26/8/11) (9, 10 e 11); Tubos germinativos do isolado 71 (26/8/11) (12, 13 e 14). (Caixa vermelha assinala as bandas de 2.200 Kb para os dois isolados; a caixa verde indica o arrastamento de DNA observado nos dois isolados).

Na Fig. 3.9 apesar de serem observadas duas bandas para os tubos germinativos dos dois isolados (assinaladas no interior da caixa vermelha), não podemos afirmar que correspondem apenas a dois cromossomas, sendo que as condições testadas apenas permitem separar cromossomas de baixo/médio tamanho, e as bandas observadas poderão corresponder a dois ou mais cromossomas

que não foi possível individualizar. O arrastamento observado neste gel (assinalado no interior da caixa verde) poderá resultar da degradação do DNA, e/ou da reduzida quantidade de DNA. Neste gel é ainda visível um arrastamento que poderá representar DNA mitocondrial linearizado, libertado juntamente com o DNA nuclear, aquando do rebentamento das células. O mesmo padrão foi demonstrado por Zuccaro e colaboradores (2009) para o fungo *Piriformospora indica*, onde foi possível identificar DNA mitocondrial linear e circular.

O padrão observado na Fig. 3.9 determinou a alteração das condições de electroforese, com o objectivo de separar cromossomas de maior tamanho molecular (Fig. 3.10). Testou-se o aumento do tempo de pulso (passou de 120 - 150 s para 1800 - 4800 s) e a diminuição do campo eléctrico (passou de 3 V/cm para 1,5 V/cm) necessários para a separação de cromossomas de elevado tamanho molecular (Doi *et al.*, 1992). As moléculas de maiores dimensões necessitam de um tempo pulso maior, porque migram mais lentamente no gel e a diminuição do campo eléctrico é responsável por uma redução da mobilidade das moléculas e aumento da resolução (Anand & Southern, 1990; Nassonova, 2008). Na análise da Fig. 3.10 é possível observar que a modificação destes parâmetros foi responsável por alterações no padrão observado, para as diferentes amostras e para o marcador, que não apresenta as bandas de menor tamanho molecular.

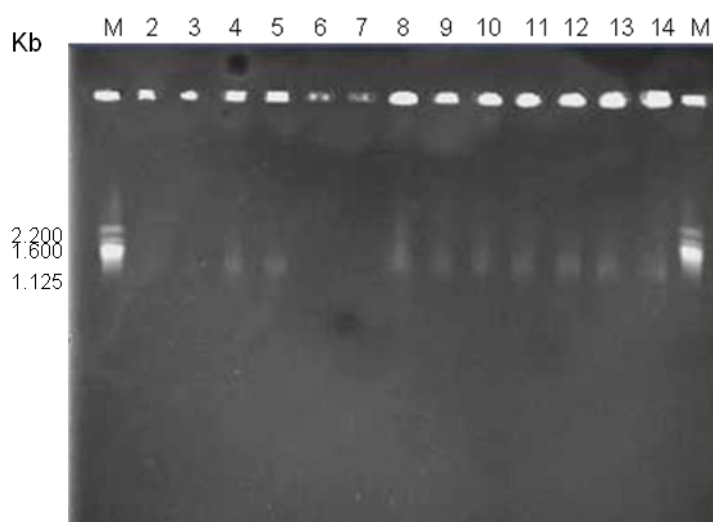


Fig. 3.10 - Electroforese em gel de campo pulsado para a separação de cromossomas de elevado tamanho molecular de *Hemileia vastatrix*. Condições testadas: tempo de pulso: 1800 – 4800 s; tempo de corrida: 72 h; campo eléctrico: 1,5 V/cm; ângulo de orientação: 106 °. O marcador molecular utilizado foi de *Saccharomyces cerevisiae* (YNN285). M- marcador molecular; Esporos do isolado 1065 (5/8/11) (2 e 3); Tubos germinativos do isolado 1065 (5/8/11) (4 e 5); Protoplastos do isolado 1065 (5/8/11) (6 e 7); Tubos germinativos do isolado 71 (26/8/11) (8,9 e 10); Tubos germinativos do isolado 1065 (26/8/11) (11,12,13 e 14).

As bandas de 2.200 Kb observadas no gel anterior da Fig. 3.9 não foram visualizadas na Fig. 3.10, contudo o marcador não se apresenta resolvido e por isso, não podemos afirmar com certeza que as bandas observadas não apresentam este tamanho molecular.

As condições de electroforese não são o único factor a influenciar os padrões observados nos géis apresentados anteriormente. O DNA presente nos discos de agarose pode ser insuficiente para a obtenção de bandas distintas no gel de electroforese.

McCluskey e colaboradores (1990) compararam a separação electroforética de amostras de protoplastos e de micélio de *Ustilago hordei* e *Tilletia caries*. Nos resultados de electroforese observaram que no caso dos protoplastos existia uma maior facilidade na libertação do DNA, resultando na observação de um maior número de bandas e mais fortes. No caso das amostras de micélio, foi observado um menor número de bandas, o que poderá estar relacionado com a existência da membrana e da parede celular que dificultam a libertação do DNA, contrariamente às amostras de protoplastos que possuem apenas membrana celular. No caso de *H. vastatrix* a baixa produção de protoplastos, determinou que a análise do cariótipo electroforético partindo dos tubos germinativos, seria a opção mais viável. O aumento da quantidade de DNA nos discos de agarose e a combinação das duas condições testadas poderiam ser uma opção exequível para a obtenção de melhores resultados.

Nos dois geis é possível observar que, apesar de o cariótipo não estar completo para *H. vastatrix*, os dois isolados apresentam um padrão igual em cada condição testada. De forma análoga, Eusebio-Cope e colaboradores (2009) demonstraram que diferentes isolados de *Cryphonectria parasitica* apresentam o mesmo padrão electroforético. Já Mehrabi e colaboradores (2007) observaram para *M. graminicola* uma variação no número e tamanho entre isolados da mesma espécie.

A técnica de PFGE não permitiu estabelecer o cariótipo electroforético de *H. vastatrix*. Deste modo, para ultrapassar as limitações desta técnica, relacionadas com a resolução de cromossomas de grandes dimensões e a migração de cromossomas de igual tamanho (responsável por erros na determinação do número correcto de cromossomas de uma espécie) (Taga *et al.*, 1998), a determinação do cariótipo de uma espécie deve incluir outra técnica complementar, o GTBM.

A utilização destas duas técnicas segundo Taga e colaboradores (1998) permite obter resultados viáveis na cariotipagem de um organismo.

3.3 Fluorescence *in situ* Hybridization

Para se proceder à identificação de rDNA nos isolados de *H. vastatrix* estudados, foram realizadas um conjunto de etapas que antecederam a execução do protocolo FISH. Primeiramente procedeu-se à marcação com biotina de uma sonda de DNA complementar com o rDNA do fungo. Após a marcação da sonda, foi realizado um Dot-blot para confirmar este passo e procedeu-se à determinação do tamanho molecular da sonda. Com a confirmação do tamanho correcto da sonda, foi executado o protocolo FISH. Este procedimento mostrou-se eficaz no estudo do rDNA de outras espécies de fungos filamentosos, como foi descrito por Taga & Murata (1994) para o fungo *B. cinerea*.

3.3.1 Confirmação da marcação da sonda por Dot-Blot

A confirmação da marcação da sonda foi feita através da execução do protocolo de Dot-Blot. Este procedimento permitiu detectar a presença da biotina, numa membrana de nylon, utilizando-se um anticorpo específico que produz uma reacção corada mediada pela fosfatase alcalina na presença da solução de detecção. O resultado positivo foi confirmado devido à formação de uma zona escura no local de aplicação das sondas, produzidas a partir dos plasmídeos pABM1 (sonda ABM1) e pABM2 (sonda ABM2) (Fig. 3.11).



Fig. 3.11 - Resultado de Dot-Blot, para as sondas ABM1 e ABM2. O aparecimento de uma zona escura nos dois casos confirma a presença da biotina.

3.3.2 Determinação do tamanho molecular da sonda

A determinação do tamanho molecular da sonda foi realizada através de um gel de agarose, no qual foi verificado o tamanho das sondas sonda ABM1 e ABM2 e comparado com os respectivos plasmídeos intactos.

No gel de agarose (Fig. 3.12) foi possível observar o aparecimento de um arrastamento na zona compreendida entre os 200 e 500 nucleótidos, confirmando o tamanho correcto da sonda, que será utilizada no protocolo FISH. O tamanho da sonda é essencial para a execução de FISH, sendo que sondas de tamanho superior a 500 bp terão uma dificuldade acrescida em aceder ao alvo.

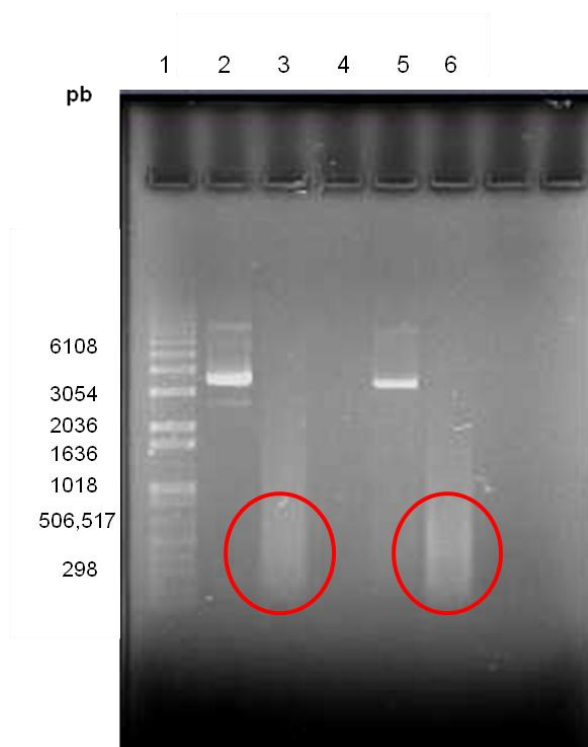


Fig. 3.12 - Confirmação do tamanho molecular das sondas ABM1, ABM2 e respectivos plasmídeos. **1** - Marcador molecular 1Kb DNA labdder; **2** - Plasmídeo pABM1; **3** - Sonda ABM1; **5** - Plasmídeo pABM2; **6** - Sonda ABM2.

3.3.3 Identificação de DNA ribossomal

Na observação das amostras resultantes do procedimento de GTBM e da aplicação do FISH foi visível um elevado background proveniente da autofluorescência emitida pelos esporos e pela parede celular dos tubos germinativos e ainda, pela provável acumulação de sonda em locais inespecíficos.

Neste protocolo FISH foram utilizadas duas sondas com homologia para as regiões de rDNA 5,8 S, 28 S e parte do 18 S, que apresentaram resultados diferentes. Na sonda ABM2 não foi observado sinal, contudo na sonda ABM1 foi observado sinal em núcleos interfásicos de *H. vastatrix*. Este resultado pode estar relacionado com a sequência de cada plasmídeo, uma vez que o plasmídeo pABM1 apresenta um fragmento maior do que o plasmídeo pABM2 (Tsuge *et al.*, 1999), explicando a ausência de sinal nestas amostras, como resultado de uma menor homologia do rDNA de *H. vastatrix* com esta sonda.

Nos resultados obtidos com a sonda ABM1 (Fig. 3.13), o sinal observado não apresentava uma forma definida nos dois isolados, o que pode indicar que o rDNA se encontrava no estado descondensado. Foi ainda possível observar uma diferença na intensidade de sinal, sendo o sinal do isolado 71 (Fig. 3.13B, C) mais forte, comparativamente com o sinal do isolado 1065 (Fig. 3.13A).

Taga e colaboradores (2003) observaram a identificação de rDNA na região do nucléolo para o fungo *C. heterostrophus* em núcleos interfásicos. Nos resultados descritos por este autor o rDNA encontrava-se em estado descondensado, sem forma definida, na zona do nucléolo e o número de pontos observados, tal como no nosso caso, também não era consensual nos núcleos interfásicos observados. Segundo este autor, a presença de rDNA em estado descondensado no nucléolo está relacionado com transcrição génica activa do rDNA, na produção de rRNA, possivelmente para suportar o crescimento dos tubos germinativos (Taga *et al.*, 2003).

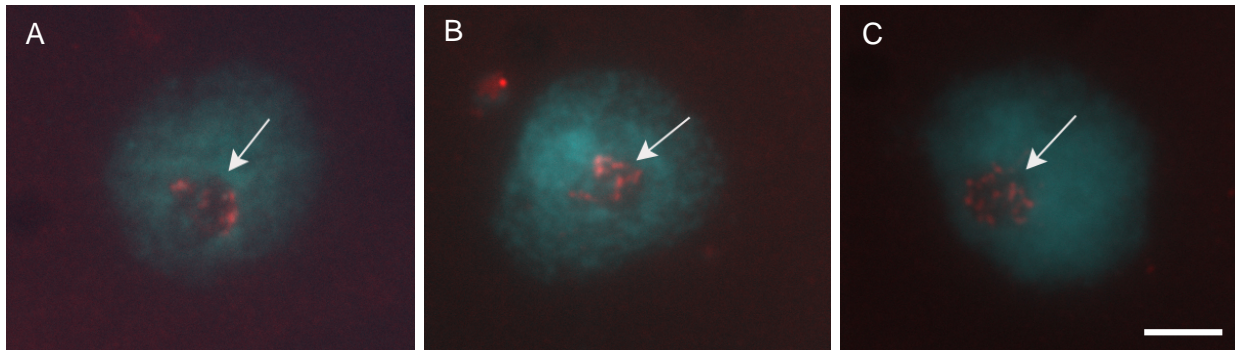


Fig. 3.13 - Localização de rDNA na zona do nucléolo em núcleos interfásicos de *Hemileia vastatrix*, sujeitos ao método do rebentamento dos tubos germinativos e Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH). O sinal vermelho representa as zonas de rDNA, e a azul temos representado o DNA corado com DAPI. Escala: 5 μ m. (A - isolado 1065; B e C - isolado 71).

Capítulo IV: Conclusões finais e perspectivas

Este estudo teve como principal objectivo a determinação do cariótipo do fungo *H. vastatrix*, o agente causador da ferrugem alaranjada do cafeeiro, utilizando duas técnicas distintas e complementares, uma citológica baseada no GTBM e outra electroforética, o PFGE. Como objectivo secundário procedeu-se à optimização da técnica de FISH em núcleos provenientes de tubos germinativos de *H. vastatrix*.

Para a cariotipagem citológica de *H. vastatrix* foi necessário optimizar a técnica GTBM. Após a testagem de duas proporções de metanol e ácido acético glacial, 22:3 e 9:1, a aplicar nas amostras e diferentes tempos de exposição (10, 15, 20, 25 e 30 min) concluiu-se que os melhores resultados na libertação dos núcleos do interior dos tubos germinativos, sem degradação do DNA, foram obtidos com 30 min de exposição dos tubos germinativos ao metanol e ácido acético glacial na proporção de 22:3.

O maior impedimento ao estabelecimento do cariótipo citológico centrou-se na dificuldade em encontrar cromossomas em metafase, uma vez que a mitose é uma fase muito rápida do ciclo celular encurtando muito o período de recolha das amostras e, por outro lado, a germinação dos esporos de *H. vastatrix* é assíncrona. Uma vez identificadas algumas figuras metafásicas, foi possível observar que o tamanho reduzido característico dos cromossomas de fungos não facilita a tarefa de os individualizar e contar. Na tentativa de aumentar a frequência de metafases observadas foi utilizado um composto químico, o tiabendazol, responsável pela paragem do ciclo celular nesta fase. Este composto apresentou resultados negativos porque não foi responsável pelo aumento de figuras metafásicas, contrariando os resultados de Tsuchiya e colaboradores (2004) que observaram no fungo *N. crassa* a eficácia deste composto na paragem do ciclo celular em metafase. Apesar das dificuldades apresentadas foram observadas algumas metafases para o isolado 71 resultado de um reforço da amostragem no intervalo de tempo escolhido, entre 17 h e 18 h após a germinação, que permitiu estimar um número mínimo de sete cromossomas e máximo de 14 para este isolado.

Apesar de ter sido possível estimar, através das técnicas citológicas, o número de cromossomas do isolado 71 é necessário aumentar a amostragem, uma vez que podemos estar perante metafases incompletas ou mal interpretadas devido ao espalhamento insuficiente dos cromossomas, que não permite individualizar a totalidade dos cromossomas da espécie. A aplicação da hidroxiureia poderá ser uma alternativa ao tiabendazol, uma vez que o primeiro composto é responsável pela paragem do ciclo celular na fase S e quando removido das amostras permite sincronização da divisão celular. Este composto apresentou resultados positivos no aumento da frequência metafásica do fungo *C. heterostrophus* (Tsuchiya & Taga, 2001). Um elevado número de observações de cromossomas irá tornar os resultados reprodutíveis e fidedignos, permitindo atribuir com confiança um número de cromossomas típicos da espécie.

A cariotipagem electroforética com base no PFGE é uma técnica complementar ao GTBM e permite ultrapassar a obrigatoriedade de observar os cromossomas numa fase específica do ciclo celular. No entanto, apresentou igualmente algumas dificuldades tendo sido a primeira de todas a produção de protoplastos. Este passo é fundamental uma vez que a imobilização de protoplastos e digestão da membrana celular nos discos de agarose permite obter cromossomas inteiros e intactos. O protocolo utilizado levou a uma baixa produção de protoplastos, o que pode ser resultado da

dificuldade desta espécie de fungo em produzir protoplastos partindo de tubos germinativos ou ainda da mistura enzimática utilizada. Como alternativa, poderiam ser testadas outras misturas enzimáticas como a Novozym 234 ou Lywallzyme, que apresentaram resultados positivos na formação de protoplastos de diferentes espécies (Chang *et al.*, 1985).

Os resultados de PFGE permitiram confirmar que a concentração de protoplastos foi insuficiente para que num gel de agarose corado com brometo de etídio fosse detectado a presença de DNA cromossómico. Para ultrapassar as limitações na produção de protoplastos substituiu-se a imobilização de protoplastos em discos de agarose por tubos germinativos que sofreram uma pré-homogeneização. Apesar de ter sido possível obter sinal, após PFGE, nos discos de agarose onde se imobilizaram tubos germinativos para os isolados 71 e 1065, o resultado não é conclusivo.

Para melhorar os resultados podemos otimizar as condições da electroforese, ao modificar alguns parâmetros, como a força do campo eléctrico. Na separação de moléculas de grandes dimensões, pode ser utilizado um valor superior ao testado, de modo a aumentar a mobilidade e a migração molecular. Na separação de moléculas de pequenas dimensões, o valor utilizado pode ser diminuído de forma a evitar a formação de arrastamentos. Para aumentar a disponibilidade do DNA, podem ser utilizadas outras alternativas de pré-tratamento como a sonicação, que utiliza ondas sonoras para provocar a lise celular ou “French Laboratory Press”, que sujeita as amostras a uma pressão, provocando a quebra da parede e membrana celular permitindo o isolamento dos núcleos.

O estabelecimento do carótipo de *H. vastatrix* permitirá a determinação do número cromossomas típicos desta espécie e ainda a identificação de polimorfismos existentes entre diferentes raças do CIFC, que eventualmente possam reflectir a variabilidade genética na patogenicidade demonstrada nas raças estudadas, nomeadamente na identificação de cromossomas supranumerários. No âmbito do projecto em que este trabalho se inclui estão a ser identificados genes ligados à virulência de *H. vastatrix* e será interessante, caso existam cromossomas supranumerários, saber se os genes ligados à patogenicidade estão localizados nestes cromossomas, utilizando para tal a técnica de FISH agora optimizada

Capítulo V: Bibliografía

- Agrios, G.N. (2005) "Plant Pathology", 5ª edição, Elsevier, pp 922.
- Aguiar, A.T.E., Fazuoli, L.C., Salva, T.J.G., Favarin, J.L. (2005) "Diversidade química de cafeeiros na espécie *Coffea canephora*", *Bragantia*, 64, 577-582.
- Aguiar, A.T.E., Guerreiro-Filho, O., Maluf, M.P., Gallo, P.B., Favarin, J.L. (2004) "Caracterização de cultivares de *Coffea arabica* mediante utilização de descritores mínimos", *Bragantia*, 63, 179-192.
- Allen, P.M. & Gottlieb, D. (1970) "Mechanism of action of the Fungicide Thiabendazole, 2- (4'-Thiazoly) Benzimidazole", *Applied Microbiology*, 20, 919-926.
- Anand, R. & Southern, E.D. "Pulsed field gel electrophoresis" In D Rickwood and B D Hames, Eds. "Gel Electrophoresis of Nucleic Acids - A Practical Approach", 2ªnd ed, 1990, p. 101-119.
- Andreasen, K. & Bremer, B. (2000) "Combined Phylogenetic analysis in the Rubiaceae - Ixoroideae: morphology, nuclear and chloroplast DNA data", *American Journal of Botany*, 87, 1731-1748.
- Anthony, F., Bertrand, B., Wilches, A., Lashermes, P., Berthaud, J., Charrier, A. (2001) "Genetic diversity of wild coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular markers", *Euphytica*, 118, 53-65.
- Anthony, F., Diniz, L.E.C., Combes, M.-C., Lashermes, P. (2010) "Adaptive radiation in *Coffea* subgenus *Coffea* L. (Rubiaceae) in Africa and Madagascar". *Plant Systematics and Evolution*, 285, 51-64.
- Avery, O.T., Macleod, M.C., McCarty, M. (1944) "Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III", *Journal of Experimental Medicine*, 79, 137-158.
- Azinheira, H.M.G. (2005) "Estudos celulares, bioquímicos e moleculares da diferenciação de *Hemileia vastatrix*", Tese de Doutorado em Engenharia Agrônoma, Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, 163 pp.
- Bachmann, B.J. & Donner, D.M. (1959) "Protoplasts from *Neurospora crassa*", *Journal of Bacteriology*, 78, 550-556.
- Beattie, A.D. (2006) "Genomic Analysis of Pyrenophora Teres: avirulence gene mapping, karyotyping and genetic map construction", Ph.D in Philosophy, University of Saskatchewan, Saskatoon, 150 pp.
- Berthaud, J. & Charrier, A. "Genetic resources of *Coffea*", In R.J. Clarke & R., MacRae Eds. "Coffee", Elsevier Applied Science Publishers, London and New York, 1988, p. 129-165.
- Bettencourt, A. (1981) "O melhoramento genético do cafeeiro", CIFC/JICU.
- Birren, B.W., Lai, E., Clark, S.M., Hood, L., Simon, M.I. (1988) "Optimized conditions for Pulsed Field Gel Electrophoresis Separations of DNA", *Nucleic Acids Research*, 16, 7563-7582.
- Borbye, L., Linde-Laursen, I., Christiansen, S.K., Giese, H. (1992) "The chromosome complement of *Erysiphe graminis* f.sp *hordei* analysed by light microscopy and field inversion gel electrophoresis", *Mycology Research*, 96, 97-102.
- Castilho, A. & Heslop-Harrison, J.S. (1995) "Physical mapping of 5S and 18S-25S rDNA and repetitive DNA sequences in *Aegilops umbellulata*", *Genome* 38, 91-96.
- Chang, S.T., Li, G.S.F., Peberdy, J.F. (1985) "Isolation of protoplasts from edible fungi", *Mircen Journal*, 1, 185-194.
- Charrier, A. & Berthaud, J. "Botanical Classification of Coffee" In M. N. Clifford & K. C. Willson Eds "Coffee: Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage", Avi Publishing Company, 1985, 457 pp.
- Chinnappa, C.C. & Sreenivasan, M.S. (1965) "Cytological studies on germinating teliospores of *Hemileia vastatrix*", *Caryologia*, 18, 625-631.
- Chinnappa, C.C. & Sreenivasan, M.S. (1967) "Cytology of *Hemileia vastatrix*", *Caryologia*, 21, 75-82.
- Choi, H.W., Lemaux, P.G., Cho, M.J. (2002) "Use of fluorescence in situ hybridization for gross mapping of transgenes and screening for homozygous plants in transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.)", *Theoretical and Applied Genetics*, 106, 92-100.
- Chu, G. (1990) "Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Theory and Practice", *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 1, 129-142.
- Chu, G., Vollrath, D., Davis, R.W. (1986) "Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields", *Science*, 234, 1582-1585.

- Clifford, M.N. & Willson, K.C. (1985) "Coffee: Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage", *The Avi Publishing Company, INC*, 32.
- Covert, S.F. (1998) "Supernumerary chromosomes in filamentous fungi", *Current Genetics*, 33, 311-319.
- Davis, A.P., Govaerts, R., Bridson, D.M., Stofellen, P. (2006) "An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae)", *Botanical Journal of the Linnean Society*, 152, 465-512.
- Davis A. P., Chester M., Maurin O., Fay, M., (2007). "Searching for the relatives of *Coffea* (Rubiaceae, Iroxoideae): the circumscription and phylogeny of *Coffeae* based on plastid sequence data and morphology", *American Journal of Botany*, 94, 313-329.
- Diniz, I., Talhinhas, P., Azinheira, H.G., Várzea, V., Medeira, C., Maia, I., Petitot, A., Nicole, M., Fernandez, D., Silva, M.C. (2012) "Cellular and molecular analyses of coffee resistance to *Hemileia vastatrix* and nonhost resistance to *Uromyces vignae* in the resistance-donor genotype HDT832/2", *European Journal of Plant Pathology*, 133, 141-157, DOI 10.1007/s10658-011-9925-9.
- Doi, M., Homma, M., Chindamporn, A., Tanaka, K. (1992) "Estimation of chromosome number and size by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in medically important *Candida* species", *Journal of General Microbiology*, 138, 2243-2251.
- Dolezel, J. & Greilhuber, J. (2010) "Nuclear genome size: Are we getting closer?", *Cytometry*, 77, 635-642.
- Emerson, S. & Emerson, M.R. (1958) "Production, reproduction and reversion of protoplasts like structures in the osmotic strain of *Neurospora crassa*", *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 44, 668-671.
- Eusebio-Cope, A., Suzuki, N., Sadeghi-Garmaroodi, H., Taga, M. (2009) "Cytological and electrophoretic karyotyping of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*", *Fungal Genetics and Biology*, 46, 342-351.
- Fernandes, R.C., Evans, H.C., Barreto, R.W. (2009) "Confirmation of the occurrence of teliospores of *Hemileia vastatrix* in Brazil with observations on their mode of germination", *Tropical Plant Pathology*, 34, 108-113.
- Gall, J.G. & Pardue, M.L. (1969) "Formation and detection of RNA-DNA Hybrid molecules in cytological preparations", *Genetics*, 63, 378-383.
- Gander, J.E. (1974) "Fungal cell wall glycoproteins and peptide-polysaccharides", *Annual Review of Microbiology*, 28, 321-325.
- Garrido, C., Carbú, M., Fernández-Acero, F.J., Vallejo, I., Cantoral, J.M. (2009) "Phylogenetic relationships and genome organization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose in strawberry", *European Journal of Plant Pathology*, 125, 397-411.
- Gunderson, K. & Chu, G. (1991) "Pulsed-Field Electrophoresis of Multimegabase-sized DNA", *Molecular and Cellular Biology*, 11, 3348-3354.
- Gurrieri, S., Smith, S., Bustamante, C. (1999) "Trapping of Megabase - Sized DNA Molecules during Agarose Gel Electrophoresis", *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 96, 453-458.
- Herschleb, J., Ananiev, G., Schwartz, D.C. (2007) "Pulsed-field gel electrophoresis", *Nature Protocols*, 2, 677-684.
- Jiang, J. & Gill, B.S. (2006) "Current status and the future of fluorescence in situ hybridization (FISH) in plant genome research", *Genome*, 49, 1057-1068.
- Kim, B.H., Kang, J.H., Jin, M., Kim, H.V., Shim, M.J., Choi, E.C. (2000) "Mycelial protoplast isolation and regeneration of *Lentimus lepideus*", *Life Sciences*, 66, 1359-1367.
- Kolmer, J.A., Ordonez, M.E., Groth, J.V. (2009) "The Rust Fungi", *Encyclopedia of Life Sciences*, Wiley.
- Lashermes, P., Trouslot, P., Anthony, F., Combes, M.C., Charrier, A. (1996) "Genetic diversity of RAPD markers between cultivated and wild accessions of *Coffea arabica*", *Euphytica*, 87, 59-64.
- Lukács, G., Takó, M., Nyilasi, I. (2006) "Pulsed-Field Gel Electrophoresis: A versatile tool analysis of fungal genomes", *Acta Microbiologica et Immunologica Hungaria*, 53, 95-104.
- Maglio, C.A.F. (2006) "Cytogenetics of coffee", *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18, 37-44.

- Marchi, C.E., Brommonschenkel, S.H., Queiroz, M.V., Mizubuti, E.S.G. (2006) "Isolamento e regeneração de protoplastos de *Magnaporthe grisea*", *Summa Phytopathologica*, 32, 232-238.
- Mathew, K.M., Hui, C., Smith, C.L., Cantor, C.R. (1988) "High-Resolution Separation and Accurate Size Determination in Pulsed- Field Gel Electrophoresis of DNA", *Biochemistry*, 27, 9204-9210.
- McCain, J.W., Hennen, J.F. (1984) "Development of the Uredinial Thallus and Sorus in the Orange Coffee Rust fungus, *Hemileia vastatrix*", *Phytopathology*, 74, 714-721.
- McClintock, B. (1945) "*Neurospora*. I. Preliminary observations of the chromosomes of *Neurospora crassa*", *American Journal of Botany*, 32, 671-678.
- McCluskey, K., Russel, B.W., Mills, D. (1990) "Electrophoretic karyotyping without the need for generating protoplasts", *Current Genetics*, 18, 385-386.
- McCook, S. (2006) "Global rust belt: *Hemileia Vastatrix* and the ecological integration of world coffee production since 1850", *Journal of Global History*, 1, 177-195.
- McCook, S. (2008) "Chronicle of a plague foretold. Crop epidemics and the Environmental History of Coffee in the Americas", *Varia Historia*, 24, 87-111.
- Mehrabi, R., Taga, M., Kema, G. H.J. (2007) "Electrophoretic and cytological karyotyping of the foliar wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* reveals many chromosomes with a large size range", *Mycologia*, 99, 868-876.
- Mehrabi, R., Taga, M., Aghaee, M., Wit, P.J.G.M., Kema, G.H.J. (2012) "Karyotyping Methods for Fungi". In Bolton, M.D., Thomma, B.P.H.J., Eds. "Plant Fungal Pathogens – methods and protocols", Humana Press, Springer Protocols, pp. 591-602.
- Mills, D. & McCluskey, K. (1990) "Electrophoretic karyotypes of fungi: The new cytology", *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 3, 351-357.
- Montagnon, C. & Bouharmont, P. (1996) "Multivariate analysis of phenotypic diversity of *Coffea arabica*", *Genetic Resources and Crop Evolution*, 43, 221-227.
- Moter, A. & Gobel, U.B. (2000) "Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms", *Journal of Microbiological Methods*, 41, 85-112.
- Nassonova, E., S. (2008) "Pulsed Field Gel Electrophoresis: Theory, Instruments and Application", *Cell and Tissue Biology*, 2, 557-565.
- Nutman, F. J., Roberts, F.M., Clarke, R.T. (1963) "Studies on the Biology of *Hemileia vastatrix* Berk. & Br." *Transactions of the British Mycological Society*, 46, 27-44.
- Paddock, S.W. "Confocal Microscopy- Methods and Protocols", Humana Press – Methods in Molecular Biology, Vol. 122, 1999, 464 pp.
- Panteu, M.P. & Typas, M.A. (2005) "Electrophoretic karyotype and gene mapping of the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae*", *FEMS Microbiology Letters*, 245, 213-220.
- Podila, G.P., Rogers, L. M., Kolattukudy, E. (1993) "Chemical Signals from Avocado Surface Wax Trigger Germination and appressorium Formation in *Colletotrichum gloeosporioides*", *Plant Physiology*, 103, 267-272.
- Poma, A., Pacioni, G., Ranalli, R., Miranda, M. (1998) "Ploidy and chromosomal number in *Tuber aestivum*", *FEMS Microbiology Letters*, 167, 101-105.
- Prakash, N. B., Debnath, M., Prasad, G.B.K.S. (2010) "Molecular diagnostics: promises and possibilities", *Springer, Nova Iorque*, pp. 158.
- Ranjendren, R.B. (1967) "A New Type Of Nuclear Life Cycle In *Hemileia Vastatrix*", *Mycologia*, 59, 279-285.
- Rijo, L. & Rodrigues, Jr. C.J. (1978) "Processo de infecção de *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. em cultivares susceptíveis e resistentes de *Coffea arabica* L.", *Garcia de Orta (Série de estudos Agronômicos)*, 5, 23-24.
- Ris, H. & Mirsky, A.E. (1949) "Quantitative cytochemical determination of desoxyribonucleic acid with the Feulgen nucleal reaction", *The Journal of General Physiology*, 4, 434-436.
- Rodrigues, C.J. (1990) "Coffee rusts: History, taxonomy, morphology, distribution and host resistance", *Fitopatologia Brasileira*, 15, 5-9.
- Rodrigues, C.J. (1992) "Professor Branquinho D'Oliveira: A Portuguese Leader In Plant Pathology", *Annual Review of Phytopathology*, 30, 39-45.

- Rodrigues, C.J., Bettencourt, A.J., Rijo, L. (1975) "Races of the pathogen and resistance to coffee rust", *Annual Review of Phytopathology*, 13, 49-70.
- Rodriguez-García, C.M., Raigosa-Flores, N., Conde-Ferráez, L., Peraza-Echeverría, L., Canto-Canché, B., James-Kay, A. (2006) "Variation in electrophoretic karyotype among Mexican isolates of *Mycosphaerella fijiensis*", *Fungal Taxonomy*, 28, 236-241.
- Santos, A.P., Wegel, E., Allen, G.C., Thompson, W.F., Stoger, E., Shaw, P., Abranches, R. (2006) "In situ methods to localize transgenes and transcripts in interphase nuclei: a tool for transgenic plant research", *Plant Methods*, 2, 1-13.
- Savile, D.B.O. (1953) "Short-season adaptation in the rust fungi", *Mycologia*, 45, 75-78.
- Schieber, E. & Zentmyer, G.A. (1984) "Coffee Rust in the Western Hemisphere", *Plant Disease*, 68, 89-93.
- Schwartz, D.C. & Cantor, C.R. (1984) "Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis", *Cell*, 37, 67-75.
- Shirane, N., Masuko, M., Hayashi, Y., (1988) "Nuclear behavior and division in germinating conidia of *Botrytis cinerea*", *Phytopathology*, 78, 1627-1630.
- Shirane, N., Masuko, M., Hayashi, Y., (1989) "Light microscopic observation on nuclei and mitotic chromosomes of *Botrytis* species", *Phytopathology*, 79, 728-730.
- Silva, M.C., Nicole, M., Rijo, L., Rodrigues, Jr. C. J. (1999) "Cytochemistry of plant-rust fungus interface during the compatible interaction *Coffea arabica* (cv. Caturra) - *Hemileia vastatrix* (race III)", *International Journal of Plant Sciences*, 160, 79-91.
- Silva, M.C., Várzea, V., Guimarães, L.G., Azinheira, H.G., Fernandez, D., Petitot, A., Bertrand, B., Lashermes, P., Nicole, M. (2006) "Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease", *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18, 119-147.
- Singh, U.P., Singh, H.B., Sakai, A. (1984) "Nuclear behavior in mycelia, conidiophores and conidia of *Erysiphe pisi*", *Transactions of the British Mycological Society*, 83, 481-485.
- Staron, T., Allard, C., Darpoux, H., Grabowski, H., Kallmann, A. (1964) "Persistance du triabendazole dans les plantes. Propriétés systémiques de ses sels et quelques données nouvelles sur son mode d'action", *Phytiatrie Phytopharmacie*, 15, 129-134.
- Stowell, R.E. (1945) "Thymonucleic acid in tumors", *Cancer Research*, 5, 283-294.
- Stowell, R.E. (1946) "Nucleic acids in human tumors", *Cancer Research*, 6, 426-435.
- Svitashev, S.K., Somers, D.A. (2002) "Characterization of transgene loci in plant using FISH: A picture is worth a thousand words", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69, 205-214.
- Swift, H.H. (1950) "The desoxyribose nucleic acid content of animal nuclei", *Physiological Zoology*, 23, 169-198.
- Taga, M. & Murata, M. (1994) "Visualization of mitotic chromosomes in filamentous fungi by fluorescence staining and fluorescence in situ hybridization", *Chromosoma*, 103, 408-413.
- Taga, M., Murata, M., Saito, H. (1998) "Comparison of different karyotyping methods in filamentous ascomycetes - a case study of *Nectria haematococca*", *Mycological Research*, 102, 1355-1364.
- Taga, M., Murata, M., Tsuchiya, D. (2003) "Dynamic changes of rDNA condensation stateduring mitosis in filamentous fungi revealed fluorescence in situ hybridization", *Mycological Research*, 107, 1012-1020.
- Teixeira, A.A., Carvalho, A., Fazuoli, L.C. (1979) "Avaliação da bebida e outras características de cultivares de *Coffea canephora* e *Coffea congestensis*", *Bragantia*, 38, 37-46.
- Tsuchiya, D. & Taga, M. (2001) "Cytological Karyotyping of Three *Cochliobolus* spp by the Germ Tube Burst Method", *Phytopathology*, 91, 354-360.
- Tsuchiya, D., Koga, H., Taga, M. (2004) "Scanning electron microscopy of mitotic nuclei and chromosomes in filamentous fungi", *Mycologia*, 96, 208-210.
- Tsuchiya, D. & Taga, M. (2010) "Fluorescence in situ hybridization for molecular cytogenetic analysis in filamentous fungi", *Methods in Molecular Biology*, 638, 235-257.
- Tsuge, T., Kobayashi, H., Nishimura, S. (1989) "Organization of ribosomal RNA genes in *Alternaria alternate* Japanese pear pathotype, a host-selective AK-toxin-producing fungus", *Current Genetics*, 16, 267-272.

- Umesono, K., Hiraoka, Y., Yanagida, M. (1983) "Visualization of chromosomes in mitotically arrested cells of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*", *Current Genetics*, 7, 123-128.
- Uzawa, S., Yanagida, M. (1992) "Visualization of centromeric and nucleolar DNA fission yeast by fluorescence in situ hybridization", *Journal of Cell Science*, 101, 267-275.
- Vallejo, I. Santos, M., Cantoral, J.M., Collado, I.G., Rebordinos, L. (1996) "Chromosomal polymorphism in *Botrytis cinerea* strains", *Hereditas*, 124, 31-38.
- Vallejo, I., Carbú, M., Munoz, F., Rebordinos, L., Cantoral, J.M. (2002) "Inheritance of chromosome-length polymorphisms in the phytopathogenic ascomycete *Botryotinia fuckeliana* (anam. *Botrytis cinerea*)", *Mycological Research*, 106, 1075-1085.
- Viaud, M., Counteaudier, Y., Levis, C., Riba, G. (1996) "Genome organization in *Beauveria bassiana*: electrophoretic karyotype, gene mapping, and telomeric fingerprint", *Fungal Genetics and Biology*, 20, 175-183.
- Waller, J.M. "Control of coffee diseases" In: Coffee: Clifford M.N., Willson R.C. Eds. "Botany, Biochemistry and production of Beans and Beverage", 1985, p.219-229.
- Ward, M. (1882) "On the morphology of *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. (the fungus of the coffee disease of Ceylon)", *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 22, 1-11.
- Wellman, F.L. (1957) "*Hemileia vastatrix*", *Federation Cafetalera da America*, San Salvador.
- Wieloch, W. (2006) "Chromosome visualization in filamentous fungi", *Journal of Microbiological Methods*, 67, 1-8.
- Zarda, B., Amann, R., Wallner, W., Schleifer, K.-H. (1991) "Identification of single bacterial cells using digoxigenin-labeled, rRNA-targeted oligonucleotides", *Journal of General Microbiology*, 137, 282-283.
- Zolan, M.E. (1995) "Chromosome-length polymorphism in fungi", *Microbiology Review*, 59, 686-698.
- Zuccaro, A., Basiewicz, M., Zurawska, M., Biedenkopf, D., Kogel, K. (2009) "Karyotype analysis, genome organization, and stable genetic transformation of the root colonizing fungus *Piriformospora indica*", *Fungal Genetics and Biology*, 46, 543-550.

Webgrafia

International Coffee Organization. Disponível em: < <http://www.ico.org/>>
Acesso: 4 de Março de 2012

International Coffee Organization. Disponível em : <<http://dev.ico.org/prices/po.htm>>
Acesso: 4 de Março de 2012

International Coffee Organization, Annual Review 2009/2010. Disponível em:
<<http://www.ico.org/documents/annual%20review%2011-e.pdf>>
Acesso: 4 de Março de 2012

International Coffee Organization. Disponível em: http://www.ico.org/pt/botanical_p.asp
Acesso: 4 de Março de 2012

Index fungorum. Disponível em: <www.indexfungorum.org>
Acesso: 4 de Março de 2012

http://www.uesb.br/professor/arminio/fitopatologia/slides/doencas_do_cafe_arquivos/slide0003_image012.jpg
Acesso: 4 de Março de 2012

Capítulo VI: Anexos

Anexo 1: Preparação de soluções**Tampão STC:**

Sorbitol 1 M

CaCl₂ 50 mM

Tris-HCL 50 mM (pH 8,0)

Tampão ST:

Sorbitol 0,6 M

Tris-HCL 100 mM (pH 8,0)

CMP:

EDTA 125 mM

Sorbitol 0,9 M (pH 7,5)

Tampão STE:

Sorbitol 1 M

EDTA 25 mM (pH 8,0)

Tris 25 mM (pH 8,0)

Tampão SE:

Sorbitol 0, 5M

EDTA 125 mM (pH 8,0)

Solução de EDTA:

Dissolver 18,6 g em 100 ml de água destilada.

Guardar a solução à temperatura ambiente

Meio LB (g/l)

10 g Peptona

5 g Extracto de levedura

5 g NaCl

Marcador 1Kb⁺

10 % (v/v) Kb stock

10 % (v/v) Orange G (10x)

Preparado em água estéril. A solução é guardada a 4 °C.

Tampão nº 1

0,1 M Tris-HCl (pH 7,5)

0,15 M NaCl

Tampão nº 2

0,5% agente bloqueador (Boeringer) preparado no tampão nº1

Tampão nº 3

5 mM MgCl_2

0,01 M NaCl

0,1 M Tris-HCl (pH 9,5)

20x SSC (V = 1 L):

NaCl (3 M): 175,5 g

$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (0,3 M): 88,2 g

Ajustar o volume com água destilada.

2x SSC (V = 500 ml): fazer uma diluição de 1:10 da solução de 20x SSC e ajustar o volume com água destilada.

SDS 10%

10 g de SDS em 100 ml de água destilada.

Guardar a solução à temperatura ambiente.

4x SSC/Tween (V = 500 ml): fazer uma diluição de 1:5 de 20x SSC e ajustar o volume com água destilada.

4xSSC 0,2% (v/v) Tween 20 (V = 500 ml): fazer uma diluição 1:5 de 20x SSC em água destilada, adicionar 1 ml de Tween 20 e misturar bem devido à sua viscosidade. Completar o volume com água destilada.

Solução de formamida 20 % em 0,1x SSC:

200 ml de formamida 100 %

5 ml de 2x SSC

Completar o volume com água até perfazer 100 ml.

Anexo 2: Abstract e Poster apresentados no Microscopy At The Frontiers of Science: 2º Congresso das Sociedades Portuguesa e Espanhola de Microscopia.

CYTOLOGIC AND KARYOLOGIC STUDIES OF *HEMILEIA VASTATRIX*, THE CAUSAL AGENT OF COFFEE LEAF RUST

**A. I. Opinião¹, P. Talhinhos², H.G. Azinheira²,
M.C. Silva², R. Abranches¹, S. Tavares^{1,2}**

¹ Plant Cell Biology Laboratory, Instituto de Tecnologia Química e Biológica, ITQB, Av. da República, 2781-901 Oeiras, Portugal.

² Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, Instituto de Investigação Científica Tropical, Quinta do Marquês, 2784-505 Oeiras, Portugal.

e-mail: anaopinio@itqb.unl.pt

Coffee Leaf Rust, caused by *Hemileia vastatrix* Berkeley and Broome, is the most important disease of Arabica coffee (*Coffea arabica*), prompting studies aimed at understanding the biology of this pathogen. The initiation of the dycariotic phase of *H. vastatrix* on coffee leaves involves specific events including uredospore germination, appressorium formation over stomata, penetration inter- and intracellular colonization [1, 2].

The present work aims to better understand *H. vastatrix* biology through the identification of its chromosomes and the characterization of nucleolar organization. First, we observed *H. vastatrix* uredospore germination and appressorium differentiation, using DAPI in order to have an insight on the nuclei (number and shape) dynamics (Fig. 1). Second, a karyological characterization was performed associating the germ tube burst method (GTBM), which releases the nuclei from the germ tube using a mixture of methanol and acetic acid [3], and DAPI. Different mitotic phases could be observed (Fig. 2) and the karyotype of two distinct races of *H. vastatrix* will be discussed. Third, the rDNA sites were identified by Fluorescence in situ hybridization (FISH). FISH was performed on fungal material that was previously treated by the GTBM. The ribosomal probes used were pABM1 and pABM2 [4]. The protocol followed was previously described in plants cells [5] and enabled the observation of the nucleolus in the interphase nucleus (Fig. 3). This analysis also allows the visualization of rDNA sites on different phases of *H. vastatrix* infection process. The dynamic of the rDNA along the mitotic cycle will be discussed.

Altogether our observations enabled a deeper insight of the DNA organization in the coffee leaf rust pathogen *H. vastatrix*, opening routes for detailed cytological localization of genes involved in pathogenicity and the detection of putative supranumerary chromosomes.

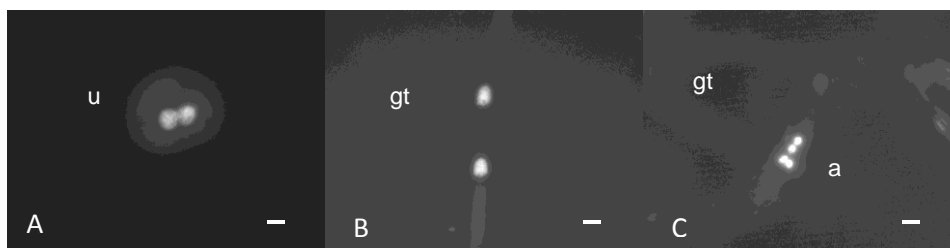


Fig 1- *Hemileia vastatrix* nuclei in pre-penetration stages (uredospore germination and appressorium differentiation). Light microscope observations: fungal structures stained with DAPI and visualized under the epifluorescence u.v. irradiation. (A) two nuclei in the uredospore; (B) the two nuclei migrating in the germ tube; (C) four nuclei in the appressorium. u- uredospore; gt- germ tube; a- appressorium. Scale bar: 5 μ m.

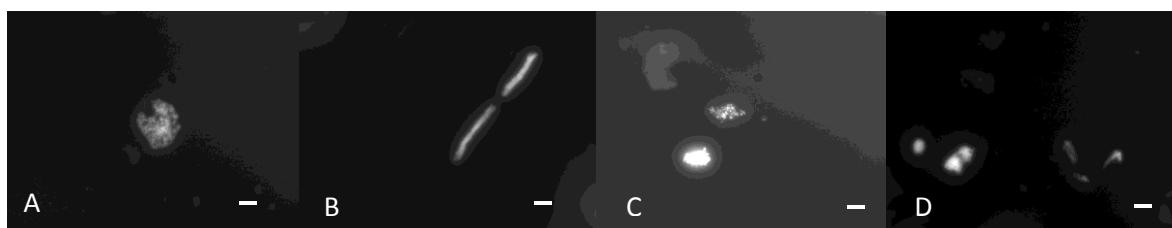


Fig. 2 – *Hemileia vastatrix* nuclei released from the burst germ tube at various mitotic stages. Nuclei were prepared using the germ tube burst method: (A) Interphase nuclei; (B) a nucleus presumably at prophase; (C) a nucleus presumably at metaphase; (D) telophase nucleus. Scale bar: 5 μ m.

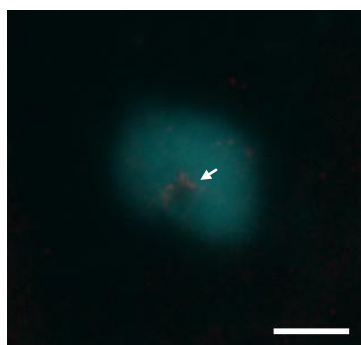


Fig.3 - Localization of rDNA on an interphase nucleus of a burst *Hemileia vastatrix* germ tube, by FISH, using the pAMB1 probe. The red signal shows the rDNA sites adjacent to the nucleolus (arrow), DNA stained with DAPI (blue). Scale bar: 5 μ m.

- [1] Rodrigues, Jr. C.J., Bettencourt, A.J. and Rijo, L. Annual Review of Phytopathology, 13 (1975) 49-70.
- [2] Silva, M. C., Várzea, V., Guerra-Guimarães, L., Azinheira, H.G., Fernandez, D., Petitot, A.-S., Bertrand, B., Lashermes, P. and Nicole, M., Brazilian Journal Plant Physiology, 18 (2006), 119-147.
- [3] Taga, M. & Murata, M. Chromosoma, 103 (1994) 408-413.
- [4] Taga, M., Tsuchiya, D. and Murata, M. Mycology, 107 (2003), 1012-1020.
- [5] Abranches, R., Santos, A.P., Wegel, E., William, S., Castilho, A., Christou, P., Shaw, P. and Stoger, E., The Plant Journal, 24 (2000), 713-723.

Type of Presentation: POSTER

Topic: 1. Microscopy in Life Sciences

CYTOLOGICAL AND KARYOLOGICAL STUDIES OF *HEMILEIA VASTATRIX*, THE CAUSAL AGENT OF COFFEE LEAF RUST

A. I. Opinião¹, P. Talhinas², H.G. Azinheira², M.C. Silva², R. Abranches¹, S. Tavares^{1,2}

¹ Plant Cell Biology Laboratory, Instituto de Tecnologia Química e Biológica, ITQB, Av. da República, 2781-901 Oeiras, Portugal.

² Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, Instituto de Investigação Científica Tropical, CIFIC/IICT, Quinta do Marquês, 2784-505 Oeiras, Portugal.
anaopinio@itqb.unl.pt



Instituto de Tecnologia Química e Biológica | Av. da República, 2781-901 Oeiras, Portugal
www.itqb.unl.pt

Introduction

Coffee Leaf Rust, caused by *Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome, is the most important disease of Arabica coffee (*Coffea arabica*). The fungus infects the lower leaf surface and produces orange pustules of uredospore sori (Figs. 1, 2). It is responsible for premature leaf fall and yield losses [1] which can account for 1-2 billion USD annually [2].

The infection process starts with uredospore germination and appressorium differentiation over stomata, followed by invasion of the substomatal chamber and tissue colonization, with differentiation of haustoria, specialized intracellular hyphae enabling the fungus to feed from living host cells [1]. Although being a biotrophic fungus, *H. vastatrix* pre-penetration structures can be obtained in vitro (Fig. 3). This work aims to better understand *H. vastatrix* biology through the identification of its chromosomes and the characterization of nucleolar organization.



Figs. 1, 2- Pustules of *Hemileia vastatrix* uredospore sori on the lower surface of coffee leaves.



Fig. 3- *In vitro* germination of *Hemileia vastatrix* uredospores and differentiation of appressoria. U- uredospore; TG- germ tube; AP- appressorium; Scale bar: 20µm.

Materials and methods

Fungal material: *Hemileia vastatrix* uredospores from two different races (race II - isolate 1065 and race VI - isolate 71 from the CIFIC/IICT collection) were germinated on artificial surfaces as previously described [3] and collected at different time points of incubation (12 to 24 h) with the purpose of identifying metaphase nuclei.

Germ tube burst method (GTBM): The germinated samples were spread on a slide and air dried. Slides were immersed in a fixative mixture (99% methanol/ glacial acetic acid = 22:3, vol/vol) during 30 min. at room temperature. The slides were flame-dried to remove the mixture and stained with DAPI (1µg/ml) [4]. The slides were mounted with an antifade mounting media (Vectashield, Vector Laboratories) and observed under UV with a Leica fluorescence microscope.

Fluorescence in situ hybridization (FISH) was performed on fungal material that was previously treated by the GTBM. The ribosomal probe pABM1 [5] was used following the protocol by [6]. The probe was labeled with biotin by nick translation and detected with extravidin-Cy3 (red fluorescence). Chromosomes were stained with DAPI (1µg/ml) and the slides were observed with a Leica fluorescence microscope. Deconvolution (Fig. 5 only) was done with Metamorph 7.6 and images were edited with Adobe Photoshop 7.0.

Results

Mitotic cell division stages

Nuclear division was monitored along uredospore germination until the differentiation of appressoria, with the purpose of identifying the most appropriate time-point to observe metaphase nuclei. Confirming previous reports of a relative asynchrony, different mitotic and cellular differentiation phases were identified simultaneously, for both isolates. After the migration of both nuclei from uredospore (Fig. 4A) to the germ tube (Fig. 4B), the prophase was detected as the nuclei become more elongated with bright threads of DNA (Figs. 4C,D). The possible first stage of metaphase was identified at 17 h (Fig. 4E). Anaphase was not detected, and telophase was also very rare (Fig. 4F). Interphase nuclei (both before prophase and after telophase) were easily identified by the nucleolar region, which is less brightly stained by DAPI (Fig. 4G). At the end of the cycle, four interphase nuclei could be observed in appressoria (Fig. 4H). The time-point 17h was thus selected for subsequent studies.

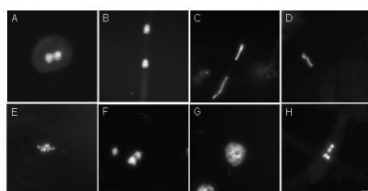


Fig. 4 - Nuclear cycle of *Hemileia vastatrix* in pre-penetration stages. The fungal structures were stained with DAPI and visualized under fluorescence microscopy. (A) two nuclei in the uredospore (12h); (B) two nuclei migrating in the germ tube (12h); (C) and (D) nuclei probably at a prophase (15h); (E) nuclei probably at the first stage of a metaphase (17h); (F) telophase nuclei (17h45); (G) interphase nuclei (18h30h); (H) appressorium with the four nuclei (24h). Scale bar: 5µm. (A,B,G,E - isolate 71; others - isolate 1065).

Karyological characterization

Different degrees of chromosome condensation were observed, leading to a low number of metaphases with highly condensed and clearly distinct chromosomes. The observation of three different metaphase nuclei for isolate 71 suggests a chromosome number between 7 and 13.

Fig. 5A depicts seven chromosomes (orange arrows), three of which appear brighter than the others (yellow arrows), suggesting that each of them could in fact be two overlapping chromosomes, hence 7-10 chromosomes. Similarly, Fig. 5B shows 8-12 chromosomes, with the green arrow indicating a putative chromosome. Fig. 5C shows 11-13 chromosomes.

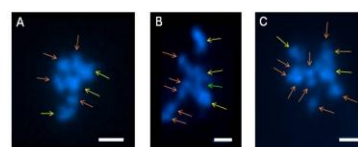


Fig. 5- Karyotype of *Hemileia vastatrix*. Three metaphase nuclei (A, B, C) of isolate 71 obtained by the GTBM (17h incubation), stained with DAPI. Orange arrows denote individual chromosomes. Yellow arrows indicate putatively overlapping chromosomes. Green arrow indicates a putative chromosome. Scale bar: 1 µm.

rDNA FISH

In both isolates, rDNA was detected within the nucleolus domain (Fig. 6, red signal) without a defined shape, which could indicate that it is in a decondensed state. The application of FISH for low copy number sequences will allow studying the organization of candidate virulence genes in the genome of *Hemileia vastatrix*. These candidate genes will become available from on-going large scale transcriptomic characterization [7, Talhinas et al. unpublished].

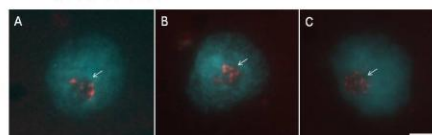


Fig. 6 - Identification of rDNA sites by FISH using the pABM1 probe on interphase nuclei of a burst *Hemileia vastatrix* germ tube. The red signal (arrow) shows the rDNA sites in the nucleolus of isolate 1065 (A) and isolate 71 (B,C). DNA stained with DAPI. Scale bar: 5µm.

Conclusions

- The observation of *Hemileia vastatrix* metaphase nuclei along the cell cycle allowed us to estimate a number of chromosomes between 7 and 13, but further nuclei need to be analysed until a robust count can be reached. Additionally, this information will be confirmed by Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) in which the chromosomes are separated by their size. The karyotype of *H. vastatrix* is ill-defined at the moment and therefore our study will have a major impact in the advance of this field of research.
- The protocol for detection of rDNA sequences by FISH was optimized for this particular fungus and allowed us to identify the rDNA in interphase nuclei of *H. vastatrix*. Further optimization will be carried out to allow for localization of low copy number genes, namely virulence genes which are thought to be involved in host-pathogen interactions.

References:

- [1] Silva et al. (2006) Braz J Plant Physiol 18, 119-147
- [2] McCook (2006) J Global Hist 1, 177-195
- [3] Vieira et al. (2011) Eur J Plant Pathol (in press). DOI 10.1007/s10658-011-9864-5
- [4] Tsuchiya & Taga (2001) Phytopathology, 91, 354-360
- [5] Taga et al. (2003) Mycologia, 107, 1012-1020
- [6] Castilho & Heslop-Harrison (1995) Genome, 38, 91-96
- [7] Fernandez et al. (2011) Mol Plant Pathol (in press). DOI 10.1111/j.1364-3703.2011.00723.x

Acknowledgements

This work was supported by Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal) through PEst-OE/EOB/LA0004/2011 (at ITQB/UNL) and PTDC/AGR-GPL/114949/2009 (at CIFIC/IICT and ITQB/UNL). S. Tavares received a postdoctoral grant from FCT (SFRH/BPD/65965/2009). We thank to Takashi Tsuge for providing the plasmid clones and Ana Sofia Pires for helping with the FISH procedure.